



Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Máster en Biología Molecular y Celular – 2019/2020

Trabajo fin de máster

Análisis de la interacción entre proteínas Fur de
Anabaena PCC7120: influencia en su actividad
biológica y presencia de hetero-oligómeros *in vivo*

Analysis of the interaction between Fur proteins from *Anabaena* PCC7120:
influence on their biological activity and presence of hetero-oligomers *in vivo*

Irene Oliván Muro

Trabajo dirigido por Emma Sevilla Miguel

Universidad de Zaragoza

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Índice

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Las cianobacterias	2
2.1.1. Características generales y relevancia	2
2.1.2. Morfología	3
2.1.3. Organismos modelo en cianobacterias	4
2.2. La superfamilia de proteínas FUR	5
2.2.1. Características generales de las proteínas FUR	5
2.3. Proteínas FUR en <i>Anabaena</i> PCC7120	6
2.3.1. Interacciones entre proteínas FUR de <i>Anabaena</i> PCC7120	7
2.4. Las interacciones proteína-proteína	8
2.4.1. Relevancia de las interacciones proteína-proteína	8
2.4.2. Clasificación de las PPI	9
2.5. Los complejos proteicos transitorios como mecanismo de regulación transcripcional	10
2.5.1. Regulación transcripcional por complejos proteicos transitorios en procariotas heterótrofos	10
2.5.2. Regulación transcripcional por complejos proteicos transitorios en cianobacterias	14
2.6. Metodología para el estudio de complejos proteicos transitorios <i>in vivo</i>	16
2.6.1. Western blot en el análisis oligomérico de proteínas	16
2.6.2. Variaciones del Western Blot	18
2.6.3. Otras técnicas para el estudio de complejos proteicos transitorios <i>in vivo</i> ..	20
2.7. La proteólisis como mecanismo de regulación de la actividad proteica	21
2.7.1. Regulación por proteólisis en <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.7.2. Regulación por proteólisis en <i>E. coli</i>	23
2.7.3. Regulación por proteólisis en <i>Caulobacter crescentus</i>	23
2.7.4. Regulación por proteólisis en <i>Enterococcus faecalis</i>	23

2.7.5.	Regulación por proteólisis en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
2.7.6.	Regulación por proteólisis en cianobacterias	24
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1.	Microorganismos y condiciones de cultivo	26
4.1.1.	Cepas de cianobacterias empleadas.....	26
4.1.2.	Condiciones de cultivo	27
4.2.	Recogida de biomasa celular.....	28
4.2.1.	Preparación de muestras de proteína soluble.....	28
4.2.2.	Preparación de muestras de proteína de membrana.....	28
4.3.	Técnicas analíticas de proteínas.....	29
4.3.1.	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
4.3.2.	Western blot	30
4.4.	Ensayos de retardo en gel	32
4.4.1.	Obtención de las regiones promotoras de los genes mediante PCR	32
4.4.2.	Preparación de geles para ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)	32
4.4.3.	Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)	33
5.	RESULTADOS.....	34
5.1.	Estudio del efecto de la interacción entre FurB y FurC sobre su función fisiológica	34
5.1.1.	Efecto de la presencia de FurC sobre la unión de FurB a promotores de genes que regula	34
5.1.2.	Efecto de FurB sobre la unión de FurC a promotores de genes que regula	37
5.2.	Análisis de la presencia de hetero-oligómeros de FurC y FurB <i>in vivo</i>	38
5.2.1.	Análisis de la presencia de hetero-oligómeros (FurB/FurC) en la fracción soluble	39
5.2.2.	Análisis de la presencia de hetero-oligómeros (FurB/FurC) en la fracción de membrana.....	41
5.3.	Búsqueda de FtsH en <i>Anabaena</i> PCC7120.....	43

6.	DISCUSIÓN	46
6.1.	FurB interacciona con el complejo FurC/DNA <i>in vitro</i>	46
6.2.	No se observan hetero-oligómeros FurB/FurC <i>in vivo</i> en <i>Anabaena</i> PCC7120	47
6.3.	FurB se localiza en membranas de <i>Anabaena</i> PCC7120	48
6.4.	<i>Anabaena</i> PCC7120 contiene cuatro potenciales homólogos FtsH	50
7.	CONCLUSIONES	51
7.	CONCLUSIONS.....	51
8.	BIBLIOGRAFÍA	52

Abreviaturas

2OG: 2-oxoglutarato

ADP: *adenosine diphosphate* (adenosín difosfato)

ATP: *adenosine triphosphate* (adenosín trifosfato)

bEBP: *bacterial enhancer binding protein* (proteínas bacterianas de unión a secuencias enhancer)

BSA: *bovine seroalbumin* (seroalbúmina bovina)

Co-IP: *co-immunoprecipitation* (co-inmunoprecipitación)

C-terminal: carboxilo terminal

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTP: deoxyribonucleotide triphosphate (desoxirribonucleótido trifosfato)

DO: densidad óptica

DONS: *sodium dioctyl sulfosuccinate* (dioctil sulfosuccinato de sodio)

DTT: *1,4-dithiothreitol* (1,4-ditiotreitol)

EMSA: *electrophoretic mobility shift assay* (ensayo de retardo en gel)

FNR: ferredoxina:NADP⁺ reductasa

FRET: Förster's resonance energy transfer (transferencia de energía por resonancia de Förster)

FUR: *ferric uptake protein*

GECX: *genetically encoded chemical crosslinking* (entrecruzamiento químico genéticamente codificado)

GFP: *green fluorescent protein* (proteína fluorescente verde)

h: horas

ITC: *isothermal titration calorimetry* (calorimetría de titulación isotérmica)

kb: kilobases

kDa: kilodalton

L: litros

LDS: *lithium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de litio)

m: metros

M: molar

m/v: masa sobre volumen

mA: miliamperios

MCO: *metal-catalysed oxidation* (oxidación catalizada por metales)

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

MW: *molecular weight* (peso molecular)

ng: nanogramos

nm: nanometros

N-terminal: amino terminal

°C: grados centígrados

PAGE: *polyacrilamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida)

pb: pares de bases

PCC: Colección de cultivos de Cianobacterias del Instituto Pasteur

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PFO: perfluoro-octanoic acid (ácido perfluoro-octanoico)

PMSF: *phenylmethanesulfonyl fluoride* (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

PPI: *protein-protein interactions* (interacciones proteína-proteína)

PVDF: *Polyvinylidene fluoride* (fluoruro de polivinilideno)

qRT-PCR: *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa)

RIP: *regulated intramembrane proteolysis* (proteólisis intramembrana regulada)

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNAP: RNA polimerasa

rpm: revoluciones por minuto

S1P: site-1 protease (proteasa de sitio 1)

S2P: site-2 protease (proteasa de sitio 2)

SDS: *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sodio)

sec: segundos

TBS-T: *Tris-buffered saline with Tween 20* (solución salina tamponada con Tris con Tween 20)

Tm: temperatura de *melting*

TMB: 3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine* (3,3',5,5'-tetrametilbencidina)

V: voltios

v/v: volumen sobre volumen

WT: *wild-type* (silvestre)

µg: microgramos

µL: microlitros

µM: micromolar

µmol: micromoles

1. RESUMEN

La cianobacteria filamentosa *Anabaena* PCC7120 presenta tres proteínas de la familia de reguladores transcripcionales procariotas FUR (Ferric Uptake Regulator): FurA, FurB y FurC. Estudios previos indicaban que estas proteínas podrían estar interaccionando entre sí. Aunque la interacción entre reguladores transcripcionales no es un mecanismo regulatorio generalizado en procariotas, en la bibliografía se encuentran varios ejemplos de cómo puede afectar a la expresión génica.

En el presente trabajo se ha analizado el efecto de FurC sobre la función como regulador transcripcional de FurB, y viceversa, mediante ensayos de retardo en gel. Los resultados indicaron que la presencia de FurB llevaba a una unión potenciada de FurC al promotor de *hetZ*, sugiriendo un efecto sobre la función de FurC. Por otro lado, se ha estudiado la presencia de hetero-oligómeros FurC/FurB *in vivo* en *Anabaena* PCC7120. Sin embargo, los resultados obtenidos no han permitido observar dichos hetero-oligómeros, sugiriendo que o bien no interaccionan en las condiciones de cultivo o, lo que es más probable, que su interacción es inestable o transitoria.

Sorprendentemente, se ha detectado una alta presencia de FurB en membranas con una masa molecular superior a la esperada, lo que sugiere que podría estar unida a la membrana mediante un polipéptido. En vista de que estudios previos localizan algunas proteínas Fur en membrana y que éstas pueden ser proteolizadas mediante proteínas FtsH, se planteó la posibilidad de que este mecanismo se aplique a FurB. Análisis bioinformáticos realizados en este trabajo han permitido identificar en *Anabaena* PCC7120 cuatro homólogos a las cuatro proteasas FtsH de la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803, incluyendo un posible ortólogo FtsH3, proteína implicada en la proteólisis de Fur, ortólogo de FurA de *Anabaena* PCC7120 en *Synechocystis* PCC6803.

ABSTRACT

The filament-forming cyanobacteria *Anabaena* PCC7120 contains three proteins belonging to the FUR (Ferric Uptake Regulator) family of prokaryotic transcriptional regulators: FurA, FurB and FurC. Previous studies had shown that these proteins may be interacting with each other. Despite not being a generalized regulatory mechanism in bacteria, interaction between transcriptional regulators can have an effect on gene expression, as shown by several cases found in the bibliography.

In the present work, the effect of FurC on the activity of FurB as transcriptional regulator, and vice versa, was studied through gel shift assays. The results obtained showed that the presence of FurB leads to an enhanced association of FurC to the promoter of the

hetZ gene, which suggests an effect on its function as transcriptional regulator. Furthermore, this work includes the study of the presence of hetero-oligomers of FurB and FurC *in vivo* in *Anabaena* PCC7120. However, no such hetero-oligomers were observed, which could mean that they either don't interact in the conditions used during the experiments or that, most likely, their interaction is transient or unstable.

Surprisingly, a great proportion of FurB was found to be associated to membranes, with a molecular mass higher than expected, suggesting it might be bound to a membrane protein. Prior studies had shown that some Fur proteins could be found in membranes and be proteolized by FtsH proteins, which could apply to FurB as well. Bioinformatic analysis were carried out and led to the identification of four homologues for the four FtsH proteins from cyanobacteria *Synechocystis* PCC6803 in *Anabaena* PCC7120, including a potential orthologue for FtsH3, the protease involved in the proteolysis of Fur, the *Synechocystis* PCC6803 orthologue for FurA from *Anabaena* PCC7120.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Las cianobacterias

Pese a que la mayoría de formas de vida actuales se encuentran adaptadas a una atmósfera y océanos oxigenados, no fue hasta hace aproximadamente 2.4 giga-años cuando comenzó su oxigenación, en un periodo de tiempo conocido como el Gran Evento de Oxigenación (1,2). Esto supuso un gran cambio en el desarrollo geológico y biológico de la Tierra, y se originó principalmente a consecuencia de la aparición de los primeros microorganismos fotosintéticos: las cianobacterias (3).

2.1.1. Características generales y relevancia

Las cianobacterias son microorganismos procariotas capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, que implica la utilización de agua como donador de electrones y libera oxígeno en el proceso. Según el sistema de tres dominios de Woese, se clasifican bajo el dominio de *Bacteria* (4). Se trata de un grupo biológico altamente diverso, que ha logrado adaptarse y sobrevivir en una gran variedad de ambientes, tanto terrestres como acuáticos, incluyendo tanto aguas continentales como océanos, e incluso climas extremos como los polares o los desérticos (5).

Su impacto sobre los ciclos biogeoquímicos se mantiene en la actualidad, tanto por su capacidad de producir O₂ como por su implicación en los ciclos del carbono y del nitrógeno, dada su capacidad de fijar ambos (6). Constituyen uno de los principales productores primarios, especialmente en los océanos como parte del fitoplancton marino (7). Su relevancia en el desarrollo evolutivo terrestre puede verse también en su condición de ancestros de los cloroplastos, según la teoría endosimbiótica (8).

Pese a que tienen plena capacidad de desarrollarse y sobrevivir de forma independiente, ciertas cianobacterias son capaces de establecer simbiosis, especialmente con plantas y con hongos, aportando la capacidad de fijación de nitrógeno y, en ocasiones, de carbono, a cambio de protección contra el estrés ambiental y predatorio (9,10).

Su gran versatilidad y diversidad han hecho de las cianobacterias objeto de aplicaciones en múltiples campos: como suplemento nutricional (11), como biofertilizante (12), en biorremediación (13) o la producción biotecnológica de compuestos de valor añadido como biofuel o bioplásticos (14,15). Sin embargo, pueden suponer un problema ecológico y sanitario cuando proliferan de forma descontrolada, generando los “*blooms*” de cianobacterias (Fig. 1), que desplazan a la microbiota autóctona y pueden producir toxinas y compuestos carcinógenos (16).



Fig. 1. Bloom de cianobacterias en un estanque en Alemania. Fotografía tomada por Christian Fischer (17).

2.1.2. Morfología

La gran adaptabilidad ambiental de las cianobacterias responde en parte a su diversidad morfológica, aunque comparten una serie de elementos básicos. Las cianobacterias presentan una pared celular con una gruesa capa de peptidoglicano, y pueden tomar formas esféricas, en espiral o de bastón (18). Además, pueden encontrarse como células individuales, en colonias o formando filamentos.

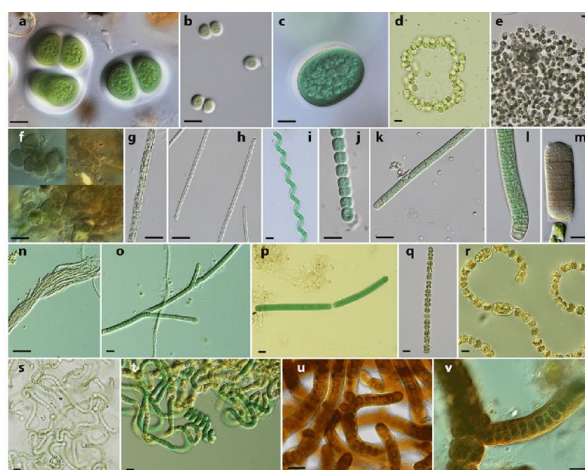


Fig. 2. Diversidad morfológica de las cianobacterias. a) *Chroococcus subnudus*, b) *Chroococcus limneticus*, c) *Cyanothece aeruginosa*, d) *Snowella litoralis*, e) *Microcystis aeruginosa*, f) *Pleurocapsa minor*, g) *Planktothrix agardhii*, h) *Limnithrix redekei*, i) *Arthrospira jenneri*, j) *Johanseninema constrictum*, k) *Phormidium* sp., m) *Oscillatoria* sp., n) *Schizothrix* sp., o) *Tolypothrix* sp., p) *Katagnymene accurata*, q) *Dolichospermum planctonicum*, r) *Dolichospermum* sp., s) *Nostoc* sp., t) *Nodularia moravica*. u/v) *Stigonema* sp. Imagen tomada de Dvořák et al (2015) (19).

De forma similar a los cloroplastos en plantas, las cianobacterias presentan membranas tilacoidales, un sistema de membranas intracelular que contiene los sistemas proteicos necesarios para desarrollar las reacciones fotosintéticas, como los fotosistemas I y II

(20). Las antenas cosechadoras de luz en los tilacoides son los ficobilisomas, complejos proteicos constituidos por pigmentos denominados ficobiliproteínas (21).

Las cianobacterias filamentosas pueden presentar diferentes tipos celulares derivados de la diferenciación de células vegetativas: heterocistos, acinetos y hormogonias. Los acinetos representan una forma de resistencia que permite la supervivencia en condiciones desfavorables, como la desecación o bajas temperaturas, para regenerar una forma vegetativa cuando las condiciones son más adecuadas para su funcionalidad (22). Por otro lado, las hormogonias son células de menor tamaño agrupadas en filamentos cortos con motilidad, constituyendo la unidad infectiva en cianobacterias simbiotes y permitiendo su dispersión (23). Al contrario que acinetos y hormogonias, los heterocistos son células irreversiblemente diferenciadas, y especializadas en la fijación de nitrógeno a amonio. Presentan una pared celular gruesa que permite formar un espacio intracelular de condiciones microoxigénicas, protegiendo así a la nitrogenasa, enzima clave en este proceso y altamente sensible al oxígeno (24).

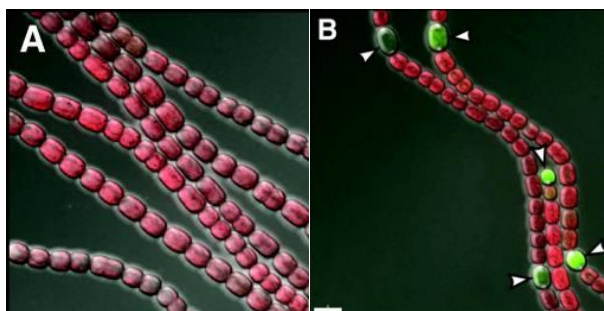


Fig. 3. Filamentos de *Anabaena* PCC7120 genéticamente modificada para expresar GFP con la diferenciación a heterocistos. A) Filamentos en cultivo en suficiencia de nitrógeno. B) Filamentos en cultivo en deficiencia de nitrógeno. Imágenes tomadas de Kumar et al (2010) (24).

De esta forma, las cianobacterias constituyen un raro ejemplo de microorganismos procariotas que pueden presentar tanto multicelularidad como diferenciación celular.

2.1.3. Organismos modelo en cianobacterias

El género de cianobacterias *Anabaena*, de la familia *Nostocaceae* y orden *Nostocales*, incluye la cepa objeto de estudio de este trabajo: la cepa *Anabaena* PCC7120. Se trata de una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos empleada frecuentemente para estudios en laboratorio, en especial para procesos de diferenciación celular y fijación de nitrógeno (25).

Otra cianobacteria ampliamente empleada como organismo modelo es *Synechocystis* PCC6803, una cianobacteria unicelular no fijadora de nitrógeno, que perdió los genes necesarios para la fijación de nitrógeno en su evolución. Se la considera un organismo modelo para el estudio de procesos como la fotosíntesis y la asimilación de carbono (5).

2.2. La superfamilia de proteínas FUR

La superfamilia de proteínas FUR está formada por reguladores transcripcionales presentes en la mayoría de organismos procariotas. El primer miembro descrito fue un represor transcripcional en *Escherichia coli*. Esta proteína era capaz de regular la expresión de sus genes diana empleando Fe^{+2} como correpresor, razón por la cual se denominó a esta proteína como Fur (del inglés *Ferric Uptake Regulator*) (26). El hierro es un micronutriente abundante, pero poco biodisponible, y su exceso es tóxico ya que da lugar a la reacción de Fenton, la conversión de H_2O_2 a la especie reactiva de oxígeno radical hidroxilo (27). Es por ello que la homeostasis de hierro debe estar finamente controlada, y la razón de la ubicuidad de Fur en organismos procariotas. De forma similar, la homeostasis de otros metales debe controlarse.

Los distintos miembros descritos de la superfamilia FUR incluye proteínas que responden a la disponibilidad de hierro (Fur, *Ferric Uptake Regulator*), manganeso (Mur, *Manganese Uptake Regulator*), zinc (Zur, *Zinc Uptake Regulator*), níquel (Nur, *Nickel Uptake Regulator*), hemo (Irr, *Iron Response Regulator*) y estrés por peróxido (PerR, *Peroxide stress Response*) (28).

2.2.1. Características generales de las proteínas FUR

Las proteínas FUR comúnmente actúan como represores homodiméricos, y se caracterizan por un peso molecular bajo de entre 13 y 20 kDa (29). Pese a su forma activa frecuentemente homodimérica, también se han descrito casos de estructuras oligoméricas estables (30). La estructura de estas proteínas consiste en un dominio N-terminal de unión a DNA de tipo hélice-giro-hélice y un dominio C-terminal de dimerización. Todas ellas comparten un motivo rico en histidinas, $\text{H}_2\text{XHX}_2\text{CX}_2\text{X}$ (Fig. 4), así como un motivo CXXC menos conservado, ambos localizados en la región C-terminal (29).

Fur <i>H. pylori</i>	S G R R Y E I A A K E H H D H I I C L H C G K I I E F A D P E I
Fur <i>E. coli</i>	G K S V F E L T Q Q H H H D H L I C L D C G K V I E F S D D S I
Fur <i>V. cholerae</i>	G K S V F E L S T Q H H H D H L V C L D C G E V I E F S D D V I
Zur (FurB) <i>A. PCC 7120</i>	G E A L Y S L A Q Q D K H - H L T C L Q C G V S I P I H Q C P V
Zur (FurB) <i>M. tuberculosis</i>	G E S V Y R R C S E H H H H H L V C R S C G S T I E V G D H E V
PerR <i>B. subtilis</i>	A S S R F D F V T S D H Y - H A I C E N C G K I V D F H Y P G L
PerR <i>S. pyogenes</i>	D L T T Y Y D F M G H Q H V N V V C E I C G K I A D F M D V D V
Consensus	G S V Y E L H H H H L I C L C G K I I E F D I

Fig. 4. Alineamiento de secuencia de los motivos ricos en histidinas de proteínas FUR de distintos microorganismos. Figura adaptada de Fillat (2014) (31).

Las diferentes proteínas FUR presentan entre uno y tres sitios de unión a metales implicados en la regulación de su acción o necesarios para el mantenimiento de su

estructura, siendo en este último caso frecuentemente Zn^{+2} , mientras que el metal regulador se corresponde a una forma de aquel cuya homeostasis regula la proteína (31). Su mecanismo de acción general consiste en la unión a las secuencias promotoras de genes que regulan al interactuar con su metal regulador, a consecuencia de lo cual comúnmente reprimen la expresión de estos genes, bloqueando el acceso de la RNA polimerasa. Estas secuencias se corresponden a secuencias palindrómicas específicas ricas en A/T presentes en los promotores. Cuando la concentración celular del metal correspondiente disminuye, la pérdida del metal regulador conlleva la disociación del DNA, permitiendo la expresión de los genes que regulan, como pueden ser transportadores de metales o sideróforos (32).

Pese a sus puntos comunes, cada una de estas proteínas difiere en el factor o factores a los que responde y el regulón que controlan en consecuencia.

2.3. Proteínas FUR en *Anabaena* PCC7120

El motivo conservado rico en histidinas permitió la identificación en el genoma de *Anabaena* PCC7120 de tres parálogos FUR: FurA (*all1691*), FurB (*all2473*) y FurC (*alr0957*) (33). Éstos se han propuesto, respectivamente, como los homólogos Fur, Zur y PerR en esta cianobacteria (33–35).

FurA constituye un regulador global, cuyo regulón comprende hasta un tercio del genoma. Se ha determinado su implicación en la regulación de genes relacionados con la homeostasis de hierro, fotosíntesis, regulación del estado redox y metabolismo del nitrógeno, entre otros, actuando como represor y activador, en ciertos casos (36). Su actividad depende de la presencia de hierro y del estado redox de la célula, y se ha observado que la unión de hemo a FurA provoca su inactivación, por lo que su función estaría siendo regulada por diversas señales relativas a la homeostasis de hierro y estado redox celular (37,38).

FurB, como homólogo Zur, regula genes relacionados con la homeostasis de cinc, codificantes para proteínas implicadas en su internalización y almacenamiento, ya sean transportadores ABC como ZnuABC, metaloproteínas de cinc como HemE, metalochaperonas como All4722 o transportadores de proteínas acomplejantes de hierro como Alr3242 (39). Sin embargo, su regulón incluye genes implicados en otras funciones como la respuesta a estrés oxidativo, como *sodA/all0070* (Mn-superóxido dismutasa A), *catA/alr0998* (Mn-catalasa A), *prxA/alr4641* (peroxirredoxina A) o *alr3090* (catalasa Alr3090), codificantes para enzimas antioxidantes (40).

Además, se ha observado que FurB es capaz de unirse de forma directa al DNA de forma inespecífica como mecanismo de protección contra el estrés oxidativo (34,41). Se ha propuesto que a bajas concentraciones podría actuar de forma específica como regulador transcripcional dependiente de cinc, mientras que, en condiciones de estrés, su concentración celular pudiera aumentar hasta niveles que permitieran la unión inespecífica (41).

Por último, FurC es el parólogo menos conocido. Estudios recientes aún sin publicar llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que su regulón es amplio, y por lo tanto podría tratarse de otro posible regulador global en *Anabaena* PCC7120. Participa en la regulación de la expresión de enzimas de acción antioxidante en respuesta a estrés por H₂O₂, como la peroxirredoxina A (gen *prxA*) o la peroxirredoxina AhpC (gen *all1541*), así como de proteínas implicadas en el ciclo de reparación del fotosistema II como FtsH (gen *ftsH*), división celular como FtsZ (gen *ftsZ*), asimilación de nitrógeno como la dinitrogenasa reductasa alternativa (gen *nifH2*) y diferenciación de heterocistos como HetZ (gen *hetZ*) (42,43).

En cuanto a su mecanismo de acción, FurC ha sido propuesta como el homólogo PerR, cuyo mecanismo de actuación difiere del de otras proteínas FUR. FurC es capaz de responder a cambios en la concentración de metales y a la presencia de H₂O₂, en un mecanismo complejo denominado oxidación catalizada por metales (MCO). En la MCO se produce la oxidación de un residuo de histidina cuando contiene hierro como metal regulador. En consecuencia, se libera de sus dianas. Por otro lado, el Mn⁺² puede competir con el Fe⁺² por su sitio de unión, protegiendo a FurC de sufrir MCO (35,44).

Interacciones entre proteínas FUR de *Anabaena* PCC7120

Pese a que cada uno de los parálogos Fur de *Anabaena* PCC7120 presenta funciones propias y un mecanismo de actuación independiente, resultados previos apuntaban hacia una regulación íntimamente relacionada entre ellas. A nivel transcripcional, tanto FurA como FurB se unen a sus propios promotores como mecanismo de autorregulación, pero se ha observado que son capaces de unirse a los promotores de los tres parálogos, mostrando una capacidad de inter-regulación. Por el contrario, FurC no presenta esta capacidad de unión a los promotores de las otras proteínas Fur, pero sí tiene un efecto alterando la capacidad de unión de FurA y FurB a sus propios promotores *in vitro* (33). Esto llevó al planteamiento de una posible inter-regulación mediante la interacción entre los distintos parálogos, potencialmente formando complejos proteicos transitorios y alternativos a los homodímeros funcionales.

La realización de experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) permitió determinar *in vitro* la interacción entre FurC y FurB, así como una interacción más débil entre FurC y FurA. Esta interacción se producía en menor medida al aumentar la fuerza iónica del medio, indicando un posible componente electrostático de su unión (45,46). Sin embargo, no se observó interacción entre FurA y FurB (45). Por otra parte, la obtención de espectros de dicroísmo circular en presencia de una mezcla FurC/FurB y FurC/FurA, diferentes al espectro teórico que se esperaría en el caso de que no hubiera interacción, sugiere que la interacción observada *in vitro* estaría alterando la estructura de al menos uno de los componentes del complejo en cada caso (46).

Aunque estos datos apoyan la posibilidad de que existan complejos FurC/FurB y FurC/FurA *in vitro*, experimentos de doble híbrido confirmaron únicamente la interacción entre FurC y FurB *in vivo* en un sistema heterólogo, y no para FurA y FurC (46).

2.4. Las interacciones proteína-proteína

2.4.1. Relevancia de las interacciones proteína-proteína

Las interacciones entre diversas biomoléculas constituyen un elemento clave en el correcto desarrollo de la fisiología de todo organismo vivo, siendo las interacciones proteína-proteína (PPI) de particular importancia. Cada proteína puede tener su función individual, pero frecuentemente no la desarrolla de forma aislada, sino que establece interacciones físicas de diversa naturaleza con otras proteínas (47).

Estas interacciones pueden tener consecuencias diversas, como la activación o inactivación de una o varias de las proteínas implicadas o la alteración de sus propiedades cinéticas, la eficiencia de canalización de sustratos entre enzimas de una misma ruta metabólica o la interacción de una de las proteínas implicadas con otras moléculas, entre otras (48). Debido a su ubicuidad e implicación en procesos celulares vitales, la interacción entre proteínas se considera incluso como potencial diana para el desarrollo de terapias, como antibióticos no convencionales (49) o fármacos antitumorales (50).

Aunque gran parte de la investigación en materia de PPI se centra en organismos eucariotas, existen múltiples organismos cuyas redes de PPI se han estudiado en detalle, como pueden ser *E. coli* (51), *Helicobacter pylori* (52), *Mycobacterium tuberculosis* (53) o la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803 (54).

2.4.2. Clasificación de las PPI

Según la existencia independiente o no de las proteínas implicadas, las PPI pueden ser obligadas o no obligadas. La interacción entre proteínas que son inestables o inactivas cuando no interaccionan se considera obligada, mientras que si su interacción sólo altera las características de una o más de las proteínas implicadas se considera no obligada (55). A su vez, las PPI pueden clasificarse en función de si se trata de una interacción permanente (altamente estable y frecuentemente irreversible) o transitoria (las proteínas pueden asociarse o disociarse) (55). Dentro de las interacciones no obligadas transitorias, la extensión temporal de los complejos formados puede ser corta, como puede ser en el caso de las PPI de naturaleza enzima-sustrato, con ejemplos como las modificaciones enzimáticas post-traduccionales de proteínas como parte de redes de regulación tanto en eucariotas como en procariotas (56,57) o la degradación proteolítica de proteínas (58).

La formación de complejos proteicos estables puede ser de nuevo obligada o no obligada, siendo en este último caso su función generalmente de modulación de una actividad previa más que requisito para ejercer una acción única. Estos complejos pueden estar compuestos por subunidades proteicas idénticas (homo-oligómeros) o diferentes (hetero-oligómeros) (55). Sus características van más allá de la suma de sus subunidades individuales, aportando también ventajas bioquímicas como pueden ser la mayor resistencia a las mutaciones y el ataque químico (59), la adquisición de nuevas funciones, aumento de la estabilidad capacidad de regulación alostérica y de accesibilidad de biomoléculas, alteración de la valencia de unión a otras moléculas o especificidad o la mayor eficiencia control de errores de traducción (permite descartar subunidades defectuosas) (47,60). Al mismo tiempo, esto permite reducir el tamaño del genoma, especialmente en el caso de homo-oligómeros, estableciendo estructuras proteicas grandes compuestas de unidades repetidas a partir de una secuencia génica correspondiente a una única unidad (60).

Se considera que los complejos proteicos comenzaron a establecerse desde etapas tempranas de la evolución. Un ejemplo sería el de las RNA polimerasas (RNAP) de organismos eucariotas, bacterias y arqueas, que consisten en complejos proteicos esenciales procedentes de un ancestro común (61). En la bacteria *E. coli*, este complejo está formado por un núcleo de 5 subunidades ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) al que se debe unir una subunidad adicional (σ) para que permitir el inicio de la transcripción (62).

Además, la probabilidad de que una proteína forme parte de un complejo es generalmente superior entre proteínas esenciales que entre aquellas no esenciales. El

análisis de Pereira-Leal y colaboradores muestra que, para proteínas de levadura, la probabilidad de que una proteína forme parte de un complejo sería de 44-58% para proteínas esenciales, y de 18-31% para no esenciales, en función de la base de datos analizada (63).

2.5. Los complejos proteicos transitorios como mecanismo de regulación transcripcional

La formación de complejos proteicos transitorios pero estables suele estar asociada a una respuesta regulatoria. Una señal puede poner en marcha un mecanismo que altere la afinidad entre las proteínas que forman el complejo, llevando a su disociación o a su asociación, en este último caso generando complejos proteicos de función o características diferentes a la de las proteínas que los constituyen (55). Son, por tanto, elementos útiles en la adaptación al medio, señalización y regulación celular a distintos niveles, incluyendo la regulación de la expresión génica.

Debido a su naturaleza transitoria y estabilidad variable, frecuentemente limitada a condiciones específicas, su estudio puede ser más complejo que el de interacciones obligadas y mantenidas en el tiempo. Sin embargo, existen múltiples casos descritos en detalle en múltiples organismos. A continuación, se describen varios ejemplos que han sido estudiados en la literatura.

2.5.1. Regulación transcripcional por complejos proteicos transitorios en procariotas heterótrofos

Pese a que la regulación por complejos proteicos transitorios de la expresión génica ha sido estudiada en mayor detalle en eucariotas, se trata de un mecanismo regulatorio también presente y bien estudiado en organismos procariotas, tanto heterótrofos como en autótrofos como las cianobacterias. Los ejemplos descritos a continuación representan algunos de los casos mejor conocidos, incluyendo complejos proteicos transitorios a nivel de subunidades de la RNAP, interacciones entre factores de transcripción o de éstos con otras proteínas.

2.5.1.1. Interacciones transitorias de subunidades de la RNAP

La transcripción génica depende en última instancia de la RNAP, cuya estructura funcional se compone de un núcleo formado por múltiples subunidades de interacción estable y obligada, al cual se unen los denominados “factores de inicio de transcripción”. El núcleo de la RNAP bacteriana, la holoenzima RNAP, está formado por las subunidades $\alpha_2\beta\beta'\omega$, cuya interacción es estable y de larga duración, mientras que los factores de inicio de transcripción procariotas, los factores σ , interaccionan de forma

transitoria con este núcleo. Dependiendo del factor σ específico que se une a la holoenzima RNAP, el complejo se unirá a unos promotores u otros, permitiendo el inicio de la transcripción de un conjunto de genes diferente (64).

Un ejemplo de bacteria heterótrofa en la que la regulación basada en factores σ está bien caracterizada es *E.coli*. En esta bacteria, el factor σ principal es σ^{70} , que regula la expresión de genes esenciales (64). Otros factores σ dirigen la RNAP hacia diferentes conjuntos de promotores, lo que permite el desarrollo de programas de expresión específicos. Por ejemplo, σ^{24} regula la respuesta a shock térmico (65). De esta forma, la interacción alternativa con diferentes factores σ genera un cambio en la expresión génica en respuesta a cambios en el entorno.

2.5.1.2. Interacciones transitorias entre factores de transcripción

La expresión génica puede regularse de forma más fina gracias a la formación de complejos proteicos alternativos de factores de transcripción, con diferentes características que los monómeros u homodímeros. A continuación, se muestran algunos ejemplos de interacciones transitorias entre factores de transcripción recogidos en la literatura.

➤ *E. coli*

Un caso de regulación transcripcional por formación de complejos transitorios en *E. coli* es el de las proteínas FlhD y FlhC. Estos activadores transcripcionales son capaces de unirse independiente al DNA y están especialmente implicados en la regulación de genes necesarios para el desarrollo flagelar. Sin embargo, también son capaces de formar un hexámero compuesto de 4 monómeros de FlhD y 2 monómeros de FlhC, alterando su afinidad de unión al DNA y permitiendo la regulación de genes de desarrollo flagelar dependientes de ambos reguladores (66).

➤ *Myxococcus xanthus*

En la bacteria *M. xanthus* se han descrito varios ejemplos de interacciones que afectan al programa de expresión génica a través de factores de transcripción. Un ejemplo es el de la proteína bifuncional MrpC, que como factor de transcripción regula la expresión de genes de respuesta a la homeostasis de carbono y como antitoxina inhibe la muerte celular por interacción directa con la toxina MazF. Por otro lado, el activador transcripcional FruA regula positivamente la expresión de genes importantes en agregación y esporulación. En varios casos, esta regulación es dependiente de su interacción con MrpC, como en su unión al promotor del gen *fmgA*, coordinando la respuesta a la falta de nutrientes mediante la expresión de genes que requieren su unión cooperativa al mismo promotor (67).

Otro ejemplo en *M. xanthus* es el del regulador de respuesta RcsB, activador transcripcional implicado en diversidad de procesos, que requiere de la interacción con RcsA como coactivador de la expresión del operón de síntesis del polisacárido capsular. Alternativamente, también se ha identificado su interacción y actuación conjunta con PhoP, otro regulador transcripcional independiente (68).

Por otro lado, se ha observado que las proteínas bacterianas de unión a secuencias *enhancer* (bEBPs) HsfA y MXAN4899 de esta bacteria son capaces de interactuar y formar un hetero-oligómero, pese a que las bEBPs actúan generalmente como homo-oligómeros. De forma independiente, HsfA forma parte de un sistema de dos componentes junto con HsfB, regulando la respuesta a estrés térmico, mientras que MXAN4899 es un regulador directo de genes relacionados con la predación, movilidad y desarrollo. Su hetero-oligomerización provoca cambios en la expresión génica, ya sea por su mutuo secuestro o por unión cooperativa a nuevos promotores (69).

2.5.1.3. Interacciones transitorias entre factores de transcripción y otras proteínas

Además de interactuar entre sí, los factores transcripcionales pueden ver su actividad modificada mediante la interacción con proteínas no directamente relacionadas con la regulación de la expresión génica, como enzimas, proteínas marcadoras de sustratos para degradación o toxinas, alterando la función regulatoria del factor transcripcional.

➤ *E. coli*

La bacteria *E. coli* presenta múltiples ejemplos de este tipo de mecanismo regulatorio, como puede ser el descrito para DhaR y las proteínas codificadas en el operón *dhaKLM*, cuya expresión regula. Las proteínas DhaL, DhaK y DhaM forman un complejo proteico que cataliza la fosforilación de la dihidroxiacetona. DhaL y DhaK son capaces de modular la acción del factor transcripcional DhaR por unión mutuamente exclusiva, en función de la presencia de dihidroxiacetona. En condiciones normales, DhaL actúa como receptor intermediario de fosfato como DhaL-ATP, de forma que su transferencia a la dihidroxiacetona genera DhaL-ADP. La subunidad DhaL-ADP resultante se une a DhaR, actuando como coactivador para la expresión del operón *dhaKLM* y reprimiendo la síntesis del propio DhaR. Cuando se fosforila la totalidad de la dihidroxiacetona disponible, se acumula la forma DhaL-ATP, sin afinidad por DhaR. Así, se favorece en su lugar la unión de DhaK, que actúa como correpressor para el operón *dhaKLM* (70).

Existen otros sistemas regulatorios que incluyen tanto interacciones proteicas como interacciones con ligandos, como el de MalT, regulador transcripcional que requiere de la interacción con ATP y maltotriosa. Éstos favorecen su dimerización, adquiriendo la forma activa que permite la activación de los operones del regulón de la lactosa como

genes codificantes para sistemas de incorporación y degradación de maltodextrinas. En presencia de MalY, una proteína homodimérica con actividad β C-S liasa, mientras que en ausencia de maltotriosa se forma un complejo heterotetramérico entre MalT y MalY, que inactiva MalT y reduce su afinidad por la maltotriosa. De esta forma, MalT es incapaz de activar la expresión de los genes que regula.

➤ *Bacillus subtilis*

También se han descrito varios ejemplos de regulación por interacción entre factores de transcripción en *B. subtilis*. Un caso de este tipo es el del regulador transcripcional TnrA, que responde a la disponibilidad de nitrógeno. TnrA se encuentra activo en condiciones de limitada disponibilidad de nitrógeno combinado, activando la expresión de genes codificantes para transportadores de amonio, enzimas de degradación de asparagina o enzimas de asimilación de nitrato y nitrito, mientras que reprime la expresión de otros genes como los de la glutamina sintasa y la glutamina sintetasa. Ésta sintetiza glutamina a partir de amonio y glutamato, siendo inhibida por retroalimentación por la propia glutamina, entre otros inhibidores. En condiciones de limitada disponibilidad de nitrógeno combinado, TnrA se encuentra activa, mientras que en suficiencia de nitrógeno combinado la glutamina sintetasa se inhibe, cambia de conformación y forma un complejo con TnrA, impidiendo su unión al DNA (71).

Otro caso descrito es el de ComK, un regulador transcripcional implicado en la activación de la transcripción de genes implicados en la adquisición de competencia, la capacidad de incorporar DNA externo, como aquellos que codifican para proteínas de transporte de DNA. En condiciones normales, ComK forma un complejo con la proteína MecA, que lo recluta a la proteasa ClpC para su degradación. Sin embargo, cuando el quorum bacteriano alcanza cierto nivel, una cadena de transducción de señales lleva a la producción de ComS, que interacciona con ComK y la libera de MecA, evitando la degradación del factor de transcripción. Mientras ComS y MecA son degradados, ComK participa en la adquisición de competencia (72).

➤ *Leifsonia xyli*

La interacción proteica también juega un papel importante en los sistemas toxina-antitoxina, consistentes en una toxina estable y una antitoxina inestable que neutraliza el efecto de la toxina mediante su unión. Además, ambos se encuentran organizados en un mismo operón, estando autorregulados por unión de la antitoxina a su promotor (73). La bacteria *L. xyli* presenta un sistema toxina-antitoxina codificado en un operón *talA/B*, siendo TalB la toxina. Este sistema representa una excepción con respecto al funcionamiento común en que es el hetero-oligómero TalA-TalB el que interacciona con el promotor, y no la antitoxina de forma individual (74).

2.5.2. Regulación transcripcional por complejos proteicos transitorios en cianobacterias

Aunque existen más casos descritos en detalle en bacterias heterótrofas, la regulación transcripcional por complejos proteicos transitorios es un mecanismo presente también en cianobacterias. Los casos descritos a continuación constituyen ejemplos de la implicación de este tipo de mecanismo regulatorio a distintos niveles en cianobacterias.

2.5.2.1. Interacciones transitorias de subunidades de la RNAP

La regulación basada en interacciones proteicas a nivel de factores σ se ha estudiado en múltiples organismos procariotas, incluyendo la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803. Esta cianobacteria presenta un total de 9 factores σ , siendo SigA el responsable de la transcripción de genes esenciales durante el crecimiento exponencial. Otros factores, como los denominados “factores σ de grupo 2”, no son esenciales en condiciones óptimas de cultivo, pero permiten la adaptación a cambios ambientales (75).

Además de la interacción de unos factores σ u otros con la RNAP, la regulación de la expresión génica por factores σ se ve modulada por interacciones proteicas a otros niveles. Un ejemplo es el de la proteína de membrana ChlH, subunidad de la magnesio quelatasa, que cataliza la inserción de magnesio a los anillos de protoporfirina. Se ha observado que ChlH también actúa como factor anti- σ para SigE, un regulador positivo del catabolismo de azúcares, inhibiendo su actividad transcripcional como parte de un mecanismo regulatorio de adaptación a la transición de luz a oscuridad. En condiciones de luz, ChlH secuestra a SigE en membrana, impidiendo su acción. En oscuridad, según el mecanismo propuesto, el descenso de Mg^{+2} en el citoplasma provocaría la disociación de ChlH de membrana y, posteriormente, de SigE, que quedaría libre para asociarse a la RNAP (76).

2.5.2.2. Interacciones transitorias entre factores de transcripción y otras proteínas

La regulación post-transcripcional de factores de transcripción en cianobacterias también puede implicar la formación de complejos proteicos transitorios, con varios casos descritos. En este caso no se han descrito casos de interacción entre dos factores transcripcionales, pero sí entre un factor de transcripción y otros tipos de proteínas.

➤ *Synechocystis* PCC6803

La tiorredoxina es una proteína implicada en procesos biológicos relativos a la señalización redox, mediando la reducción de otras proteínas. Se han descrito múltiples casos de interacción de diferentes tipos de tiorredoxinas con factores de transcripción

en *Synechocystis* PCC6803, potencialmente mediando la conexión entre el estado redox de la cadena de transporte de electrones a la regulación génica (77).

Un ejemplo de este tipo de regulación implica al factor de transcripción homodimérico PedR. En condiciones de alta luminosidad, cuando la cadena fotosintética está más activa, la tiorredoxina TrxX o TrxM adquiere su forma reducida e interacciona con PedR, transfiriéndole electrones. Esto provoca un cambio conformacional transitorio que lleva a la inhibición de PedR. Cuando la célula se adapta a las nuevas condiciones, PedR se oxida y vuelve a su forma activa, activando la transcripción de sobre genes como las subunidades L, N y B de la protoclorofilida reductasa, implicada en la síntesis de clorofilas.(78).

Existen casos similares como el de ManR, represor del transportador de manganeso, que es reducido por la tiorredoxina TrxM con el paso de oscuridad a luz (79); la interacción de TrxM con SII1961, implicado en la regulación de respuesta de la maquinaria fotosintética, especialmente del contenido en fotosistema I en condiciones de alta luz y de ficobilisomas en condiciones de nitrógeno limitado (77) o LexA con la ferredoxina (80).

➤ *Anabaena* PCC7120

En el organismo objeto de estudio del presente trabajo, *Anabaena* PCC7120, no se ha definido una red de interacciones en detalle, pero existen múltiples ejemplos de interacciones descritas.

RexT es un represor transcripcional que regula la expresión de la tiorredoxina TrxA2. RexT, en presencia de H₂O₂, forma un puente disulfuro intramolecular, perdiendo su capacidad de unión al DNA y permitiendo así la expresión de TrxA2. En su forma reducida, TrxA2 es capaz de interaccionar con RexT, reduciendo el puente disulfuro del regulador transcripcional y permitiendo que recupere su actividad (81).

Un ejemplo más complejo sería el caso del eje regulatorio entre PipX, PII, la enzima N-acetil-L-glutamato quinasa (NAGK) y el regulador transcripcional NtcA. PII es una proteína homotrimérica involucrada en la adaptación a cambios en la disponibilidad de nitrógeno biodisponible, carbono y energía en respuesta a distintos efectores alostéricos como el ATP y ADP o el 2-oxoglutarato (2OG), un metabolito indicador del balance entre el carbono y el nitrógeno biodisponible en el interior celular (82). En suficiencia de nitrógeno, PII puede interaccionar con NAGK, lo que favorece su acción enzimática de síntesis de arginina, como reserva de nitrógeno. En estas condiciones, compite con NAGK la proteína adaptadora PipX, que se une a razón de tres moléculas por homotrímero de PII en abundancia de nitrógeno. El complejo PII-PipX se une al factor

transcripcional homodimérico PII_A, regulando potencialmente su acción. PII_A se ha descrito únicamente en cianobacterias, aunque su regulón no está completamente definido. En deficiencia de nitrógeno, cuando bajan los niveles de amonio, PipX se disocia de PII y aumentan los niveles de 2OG celulares: PipX libre se une como co-activador a NtcA, activado por unión a 2OG, induciendo la expresión de genes de respuesta a deficiencia de nitrógeno (83).

El estudio de las interacciones proteicas como parte de mecanismos regulatorios se mantiene relevante en la actualidad, de forma no limitada a la regulación transcripcional. Un caso reciente es el de PatA, una proteína necesaria para la diferenciación de heterocistos intercalados en los filamentos de *Anabaena*. La diferenciación celular a heterocisto en condiciones de deficiencia de nitrógeno implica la imposibilidad de volver al estado vegetativo o dividirse (84). PatA es capaz de interactuar con los componentes ZipN y SepF del divisoma, desestabilizando el denominado anillo de FtsZ, que tiene como consecuencia la inhibición de la división celular. Una vez finalizada la diferenciación, interactuaría con SepJ, localizada en los polos celulares, afectando así potencialmente a la comunicación celular entre heterocistos y células vegetativas (85).

Estos ejemplos dan a ver la relevancia y extenso impacto de la formación de complejos proteicos transitorios en la regulación transcripcional en diversos organismos, constituyendo de esta forma las interacciones entre proteínas un elemento regulatorio de la fisiología celular y la adaptación al entorno.

2.6. Metodología para el estudio de complejos proteicos transitorios *in vivo*

El estudio de complejos proteicos transitorios no es sencillo, ya que se encuentran limitados a condiciones específicas y frecuentemente conviven con otras formas, ya sea otros complejos oligoméricos o la forma monomérica de las proteínas que interactúan. Aunque se haya demostrado la capacidad de interactuar *in vitro* de dos o más proteínas purificadas, determinar su existencia *in vivo* puede ser más complejo. Sin embargo, existen diferentes métodos que se han aplicado a la detección de la presencia de este tipo de complejos *in vivo*, como los que se detallan a continuación.

2.6.1. Western blot en el análisis oligomérico de proteínas

La técnica de Western blot se ha aplicado al estudio del estado oligomérico *in vivo* de diversas proteínas en procariotas, tanto homo- como heterocomplejos. En el caso de AcrB, un transportador de membrana trimérico que forma parte de un sistema de eflujo en bacterias gram-negativas, esta técnica se ha aplicado a lisados celulares de *E. coli* WT y mutantes para AcrB en distintos residuos de cisteína. De esta forma, realizando

una separación por SDS-PAGE y revelado con anticuerpos anti-ArcB, se pudo determinar el predominio de formas triméricas, tanto lineales como circulares, coexistiendo con un cierto porcentaje de dímeros. Además, la variación de las condiciones de ensayo durante el cultivo o la incubación antes del paso de electroforesis permitió observar el efecto de la presencia de agentes reductores sobre la oligomerización, surgiendo formas monoméricas con la adición de compuestos reductores, en mayor proporción a concentraciones mayores de reductor (86).

Otro ejemplo sería el de YdiB, una ATPasa esencial de *B. subtilis*. Empleando lisados celulares de *B. subtilis* resueltos por SDS-PAGE en condiciones reductoras y con posterior revelado por Western blot con anticuerpos específicos anti-YdiB, se reveló la presencia de formas monoméricas y diméricas, confirmando la capacidad de esta proteína de formar oligómeros *in vivo*. Además, permitió determinar una diferencia entre la ratio monómero-dímero respecto a la proteína purificada, con mayor proporción de monómero *in vivo* (87).

Por otro lado, la técnica de Western blot también se ha aplicado a lisados de células de mamífero. Por ejemplo, una versión alternativa al SDS-PAGE que emplea el detergente LDS (LDS-PAGE), más adecuado para la determinación del estado oligomérico de proteínas de membrana, ha sido empleada para la determinación del estado oligomérico de la prestina, proteína involucrada en la selectividad de frecuencia y sensibilidad de la capacidad auditiva en mamíferos. Se analizaron lisados de células de ratón, observándose ras velar con anticuerpos anti-prestina la formación de bandas correspondientes a de monómeros, así como dímeros. El cambio de LDS por PFO, un detergente más suave que el LSD, permitió observar hasta tetrámeros en lisados de células de mamífero (88).

Otro ejemplo muestra su aplicación a lisados de células mesencefálicas transducidas mediante vectores virales para la expresión de α - o β -sinucleína, proteínas implicadas en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías. Provocando la sobreexpresión de una u otra, o ambas, se analizaron lisados de cultivos en presencia del ácido poli-insaturado 18:3 frente a un control, empleando anticuerpos contra una u otra sinucleína. Los resultados indicaron una inducción de la presencia de oligómeros de α -sinucleína *in vivo* respecto a la de monómeros en presencia de este ácido graso, efecto que se veía inhibido ante la expresión simultánea de β -sinucleína. Además, en este caso se observaron bandas indicativas de un potencial hetero-oligómero de α - y β -sinucleína, presente en células expresando ambas, pero no en aquellas que expresan únicamente β -sinucleína (89).

También se ha analizado mediante SDS-PAGE/Western Blot el estado de oligomerización en tejido humano de la miocilina, proteína cuyas mutaciones están frecuentemente relacionadas con el desarrollo de glaucoma. En condiciones no reductoras, se observaron bandas correspondientes a monómeros, así como oligómeros de dos o más unidades de miocilina, y bandas no correspondientes a homo-oligómeros que se consideraron hetero-oligómeros con proteínas desconocidas.

De esta forma, el análisis de extractos proteicos mediante separación electroforética SDS-PAGE y posterior revelado en paralelo de réplicas equivalentes con diferentes anticuerpos puede permitir la visualización de distintas formas oligoméricas presentes en células *in vivo*, ya sea homo-oligómeros (formas oligoméricas presentes únicamente al incubar con uno de los dos anticuerpos) o hetero-oligómeros (formas oligoméricas presentes al incubar con ambos anticuerpos independientemente).

2.6.2. Variaciones del Western Blot

Existen variaciones de este tipo de ensayo que también pueden aplicarse al estudio de interacciones proteicas. Dado que el proceso de Western Blot incluye pasos que pueden alterar las condiciones de interacción de las proteínas, especialmente si se trata de interacciones débiles, el protocolo se puede modificar añadiendo un paso de entrecruzamiento proteico. El uso de agentes entrecruzantes para proteínas sobre las muestras a analizar conlleva la unión covalente de proteínas que interaccionan, de forma que se pueda detectar su interacción incluso cuando ésta es débil o transitoria e independientemente de su desnaturalización en el proceso de análisis. Sin embargo, se trata de un tratamiento complejo, optimizado principalmente para muestras de proteína purificadas en alta cantidad, *in vitro* (90). Su aplicación a estudios *in vivo* implica de forma tradicional el entrecruzamiento en extracto crudo celular, dado que, aunque existen agentes capaces de introducirse al interior celular, son altamente reactivos y raramente compatibles con la viabilidad celular, de forma que pueden no ser representativos de la realidad biológica. Por otro lado, la falta de especificidad de la mayoría de agentes entrecruzantes genera ruido de fondo (91).

Un ejemplo de aplicación de Western blot sobre lisados celulares tratados con agentes entrecruzantes para el análisis oligomérico es el de TraD, una proteína de membrana implicada en la transferencia de material genético por conjugación en bacterias. Tras el tratamiento entrecruzante, se sometieron las muestras de lisados celulares a SDS-PAGE y Western Blot, observándose bandas correspondientes a monómeros, dímeros y complejos de alto peso molecular. En presencia o ausencia del plásmido F, la banda correspondiente al dímero desaparecía o se veía reducida, aumentando en su lugar la

proporción de altos complejos moleculares, indicando que TraD dimeriza de forma autónoma pero requiere proteínas presentes en el plásmido F para formar grandes complejos (92).

Otro ejemplo es el de la formación de hetero-oligómeros de las flotilinas 1 y 2, relacionadas con la señalización de insulina, fagocitosis, crecimiento axonal y activación linfocítica en mamíferos. Se realizó un tratamiento de entrecruzamiento sobre células de mamífero N2a, seguido de SDS-PAGE y Western blot en paralelo con anticuerpos anti-flotilina-1 y anti-flotilina-2. Esto permitió observar bandas monoméricas para ambas proteínas, así como bandas correspondientes a homo- y hetero-tetrámeros (93).

Una alternativa para realizar un entrecruzamiento proteico en células vivas es el uso de técnicas de ingeniería genética con química biocompatible como GECX (*genetically encoded chemical cross-linking*). Esta técnica consiste en modificar genéticamente un organismo para que exprese la proteína de estudio con un aminoácido no natural biorreactivo en proximidad a otra proteína, provocando el entrecruzamiento entre proteínas que interaccionan (91). Sin embargo, esto implica un proceso más costoso y complejo que puede no ser aplicable a todos los organismos. En *E. coli*, se ha aplicado a la identificación de proteínas que interaccionan con la tiorredoxina 1 *in vivo* mediante la incorporación del aminoácido no natural BprY, determinándose posteriormente por Western blot la existencia de múltiples proteínas mostrando interacción con la tiorredoxina 1 (91).

La técnica del far-Western fue desarrollada específicamente para la caracterización de interacciones entre proteínas. Ésta difiere de un Western blot en que, una vez separadas las proteínas de la muestra por electroforesis y transferidas a una membrana, el revelado no se basa en incubación con anticuerpos, sino que se emplea en primer lugar una proteína o fragmento de ella cuya interacción con las proteínas de la muestra se quiere observar. Tras la incubación, se revela gracias al marcaje directo de la proteína empleada (por radiactividad, fluorescencia, ...) o mediante un anticuerpo marcado que la reconozca. Esto permite confirmar la interacción directa entre dos proteínas conocidas, con la desventaja de que representa un ensayo *in vitro*, ya que la segunda proteína se añade siempre de una muestra purificada (94). Esta técnica se ha aplicado al estudio de la interacción entre la proteína SltF, necesaria para el desarrollo de flagelos en α -proteobacterias, con otras proteínas del bastón flagelar, en este caso mediante la separación por SDS-PAGE seguida de revelado por incubación con SltF y detección con un anticuerpo anti-SltF. Esto permitió determinar la interacción de SltF con las proteínas del bastón flagelar FlgB y FlgF (95).

Debido a los pasos de lavado tras la incubación con la proteína de interés, las interacciones débiles frecuentemente no se observan en ensayos de far-Western blot. La combinación de entrecruzamiento proteico y far-Western blot supone una alternativa para la detección de estas interacciones, realizando un tratamiento con agentes entrecruzantes tras la incubación. Esto se ha aplicado a la ferredoxina de *Hydrogenobacter thermophilus*, implicada en la transferencia de electrones a otras proteínas con las que forma complejos transitorios débiles. En comparación con el far-Western blot, el far-Western blot con entrecruzamiento permitió observar con mayor claridad la interacción de la ferredoxina con la Ferredoxina:NADPH oxidorreductasa y la 2-oxoglutarato:Ferredoxina oxidorreductasa, así como la interacción con la Piruvato:NADPH oxidorreductasa, no detectada por el método tradicional (96).

2.6.3. Otras técnicas para el estudio de complejos proteicos transitorios *in vivo*

La detección de interacciones *in vivo* puede realizarse por otras técnicas, como la co-inmunoprecipitación (Co-IP), técnicas genéticas basadas en fluorescencia como la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) o la microscopía de colocalización de fluorescencia y los ensayos de doble híbrido.

La técnica de Co-IP se basa en anticuerpos que capturan específicamente una de las proteínas de interés en un extracto celular, incluyendo las formas en complejo con otras proteínas. Posteriormente se pueden liberar las proteínas fijadas e identificar o confirmar la composición de los complejos mediante espectrometría de masas o Western blot, con la desventaja de que se pierde información acerca de la estequiometría de unión (97).

El fenómeno de FRET consiste en la transferencia de energía entre dos moléculas fluorescentes al aproximarse, lo que se traduce en una pérdida de fluorescencia de emisión del donador y aparición de la del aceptor. Si se incorporan sondas fluorescentes compatibles a una pareja de proteínas mediante ingeniería genética, se puede detectar su interacción de forma dinámica *in vivo* (98). La colocalización de fluorescencia también implica el marcaje fluorescente de las proteínas cuya interacción se estudia, pero la detección se realiza por microscopía confocal de fluorescencia, a fin de determinar la presencia de ambas en la misma localización celular de forma simultánea (99).

Los sistemas de doble híbrido se basan en la detección de interacciones proteicas *in vivo* en un sistema de expresión heteróloga mediante la activación transcripcional de un gen reportero fisiológicamente regulado de forma directa o indirecta por una proteína activadora. Esta proteína se divide en dos dominios, cada uno de los cuales se fusiona a una de las proteínas de estudio, de forma que su interacción restaure su función y lleve a la expresión del gen reportero (100).

Estas técnicas *in vivo* y la inmunodetección de oligómeros en extractos celulares por Western blot permiten la determinación de que estas interacciones tienen lugar *in vivo*, no únicamente de su capacidad de interaccionar en presencia de ambas.

2.7. La proteólisis como mecanismo de regulación de la actividad proteica

La adaptación celular a distintas señales implica mecanismos diferentes según el tipo de respuesta necesaria. Un mecanismo regulatorio que acelera el proceso es el de producir previamente las proteínas necesarias para realizar una determinada acción, pero mantenerlas de forma inactiva hasta recibir una señal específica, sin necesidad de mecanismos de regulación transcripcional o traduccional. Este es el caso de las pro-proteínas, procesadas proteolíticamente para generar la proteína activa, o la unión a membrana, que frecuentemente implica también un paso de procesamiento proteolítico para su liberación. Esto permite el control espacial y temporal de la acción de la proteína implicada.

La proteólisis regulada puede ser procesiva (degradación completa de la proteína) o no procesiva (corte o cortes que generan una forma proteica alternativa con actividad modificada). La proteólisis procesiva implica la eliminación de proteínas cuya acción no es necesaria o ser una acción basal inhibida ante la señal adecuada para que la proteína sustrato pueda actuar, mientras que la no procesiva supone un paso de maduración proteica o genera una forma proteica que puede posteriormente ser degradada por completo, por exposición de motivos específicos de reconocimiento (101).

Un mecanismo frecuente implicado en este tipo de procesos de señalización es la proteólisis intramembrana regulada (RIP, del inglés *regulated intramembrane proteolysis*), tanto en organismos eucariotas como procariotas. Este proceso implica el corte de una proteína localizada en la membrana, ya sea en su zona intramembrana o cerca de la superficie, por parte de proteasas denominadas I-Clips (102). Estos cortes tienen lugar en dos pasos, mediados por dos grupos de proteasas distintos: S1P (site-1 protease) y metaloproteasas S2P (site-2 protease). Este tipo de proteasas se encuentran ampliamente distribuidas en todas las formas de vida, dando a ver la relevancia de este mecanismo regulatorio (103,104). Sin embargo, no todos los casos de regulación proteolítica se corresponden a RIP.

Los ejemplos expuestos a continuación representan distintos casos de regulación por proteólisis en diversos organismos procariotas, en especial casos conocidos que implican retención en membrana.

2.7.1. Regulación por proteólisis en *B. subtilis*

Existen múltiples estudios realizados en *B. subtilis* acerca de la regulación mediante proteólisis de proteínas en múltiples procesos celulares distintos. Los ejemplos a continuación representan algunos de los casos mejor conocidos.

En situación de limitación nutricional, *B. subtilis* comienza un proceso de esporulación, en el cual varios pasos están regulados por proteólisis. La esporulación comienza con la división en dos compartimentos celulares: la célula madre y la forespora. Más adelante, la célula madre endocita la forespora, que genera una estructura de doble membrana, la interior con una composición proteica diferente a la exterior, que se corresponde a la de la célula madre (105). En este proceso, es vital la expresión de genes regulados por el factor σ^E , que se sintetiza de forma inactiva como pro-proteína, asociada con la membrana de la célula madre. En este caso, la forespora secreta el factor SpoIIIR, activando la proteasa de membrana SpoIIIGA y provocando de esta forma el procesamiento de pro- σ^E y liberación de σ^E activo al citosol de la célula madre, donde dirige la transcripción de más de 250 genes (105,106). Este proceso no se clasifica como RIP, ya que SpoIIIGA no pertenece a la familia de proteasas I-Clips.

El mecanismo de transducción de señales que lleva a la activación de otro factor σ implicado en esporulación en fases más avanzadas, σ^K , sí representa un ejemplo de RIP. σ^K se sintetiza como pro- σ^K , cuya prosecuencia permite su localización específica en la membrana de la célula madre y previene su unión a la RNAP (107). La diferencia de composición entre las membranas de la célula madre y la forespora endocitada es vital en su activación: las proteínas de membrana SpoIVFB, SpoIVFA y BofA, implicadas en su activación, se encuentran localizadas específicamente en la membrana externa de la forespora, procedente de la célula madre (108). SpoIVFA y BofA mantienen inactiva a SpoIVFB, la proteasa S2P que lleva a cabo el procesamiento de σ^K . Tras ser endocitada, la forespora libera al espacio entre membranas el factor SpoIVB, que provoca el corte de SpoIVFA y la consecuente activación de SpoIVFB (109). El procesamiento de pro- σ^K libera σ^K al citoplasma, donde regula la expresión de genes necesarios para completar el proceso de esporulación (105).

Un tercer caso, no relacionado con la esporulación, es el del factor σ de respuesta a estrés por choque salino σ^W . El factor anti- σ transmembrana RsiW retiene e inhibe σ^W . En respuesta a una situación de choque alcalino, se activa una proteasa S1P que actúa sobre el dominio periplásmico de RsiW, tras lo cual actúa la proteasa YluC, del grupo de S2P. Esto permite la liberación al citoplasma de una forma degradada de RsiW unida aún a σ^W y, aunque se desconoce el paso final de liberación de σ^W , lleva a la expresión de los genes del regulón de este factor σ (110).

2.7.2. Regulación por proteólisis en *E. coli*

Otro organismo sobre el cual se han realizado múltiples estudios en materia de regulación mediante proteólisis es *E. coli*. Por ejemplo, esto se ha descrito para el factor σ^E , implicado en la respuesta a estrés por desplegamiento proteico en la envuelta, se mantiene inactivo mediante RseA, un factor anti- σ transmembrana que lo retiene en la membrana mediante su dominio citosólico e inhibe su acción (111). En respuesta a la presencia de proteínas desplegadas en la membrana externa, la proteasa S1P de membrana interna DegS se activa, realizando un corte en el dominio periplásmico de RseA. El corte provoca que este factor anti- σ se vuelva susceptible al procesamiento por RseP (también denominada YaeL), la proteasa S2P que finalmente permite la liberación del dominio citoplasmático de RseA de la membrana (112). RseA permanece unido a σ^E , pero su C-terminal generado por proteólisis es reconocido por la proteasa ClpXP, degradando específicamente RseA y liberando σ^E intacto (113).

2.7.3. Regulación por proteólisis en *Caulobacter crescentus*

Aunque en menor medida que en los microorganismos anteriores, también existen casos de regulación por proteólisis descritos en detalle en otras bacterias, como *C. crescentus*.

PodJ es una proteína transmembrana implicada en el desarrollo del flagelo polar en *C. crescentus*. La proteasa soluble PerP actúa como S1P y realiza el primer corte en su dominio periplasmático, seguido de la proteasa de membrana MmpA, que libera una forma truncada correspondiente al dominio citoplasmático de PodJ (114). Esta forma truncada se localiza en el flagelo polar incipiente, donde actúa como andamio celular para reclutar proteínas estructurales y de señalización implicadas en su desarrollo, y es degradada más adelante por una tercera proteasa (115).

2.7.4. Regulación por proteólisis en *Enterococcus faecalis*

Un ejemplo de regulación por proteólisis descrito en la bacteria *E. faecalis* representa un caso poco común, en el que el producto del corte se libera al medio y no al interior celular. La feromona cAD1 de *E. faecalis* consiste en un péptido de 8 aminoácidos que induce la respuesta de cortejo en otros enterococos que contienen el plásmido pAD1. Este péptido proviene de una proteína precursora de 143 aminoácidos insertada en la membrana plasmática, que sufre un procesamiento por doble corte: en primer lugar, una peptidasa señal elimina la región extracelular, mientras que la proteasa de membrana Eep, identificada como S2P, realiza un corte en la región transmembrana que libera el fragmento de 8 aminoácidos al exterior celular (116).

2.7.5. Regulación por proteólisis en *M. tuberculosis*

Este tipo de regulación también se puede observar en microorganismos patógenos relevantes, como *M. tuberculosis*. Esta bacteria presenta una proteína denominada LppM, implicada en el bloqueo de la fagocitosis y de la acidificación fagosomal en el macrófago (117). Fue descrita en primer lugar como proteína anclada a la membrana, pero más recientemente se ha descrito que sufre un segundo paso de maduración por corte enzimático que permitiría su secreción al medio (118).

2.7.6. Regulación por proteólisis en cianobacterias

En cianobacterias también existen algunos ejemplos de proteínas que sufren proteólisis. El primer ejemplo sería el de la ferredoxina:NADP⁺ reductasa (FNR).

La FNR es una proteína que lleva a cabo la reducción de NADP⁺ en la cadena de transporte lineal de electrones, presente tanto en cianobacterias como en cloroplastos de células vegetales. En cloroplastos, la FNR se asocia a la antena del ficobilisoma a través de un linker polipeptídico denominado CpcD, que media la unión a la membrana tilacoidal y el ficobilisoma. Sin embargo, la FNR de *Synechocystis* PCC6803 no interacciona con ningún linker, sino que contiene una secuencia N-terminal adicional de 9 kDa homóloga a CpcD (119). Existe una forma truncada soluble generada por proteólisis, eliminando esta secuencia adicional e impidiendo la unión tanto al ficobilisoma como al tilacoide (120). Esta secuencia adicional también se puede encontrar en otras cianobacterias como *Anabaena* PCC 7119 (121) y *Synechococcus* PCC7002 (122).

El segundo ejemplo estaría relacionado con dos reguladores transcripcionales. Uno de ellos es el represor NdhR, implicado en la regulación del metabolismo del carbono, y el segundo es el regulador transcripcional Fur. En ambos casos las proteasas implicadas en su procesamiento son proteínas del tipo FtsH.

Las proteínas FtsH son proteasas ubicuas en procariotas y frecuentemente implicada en el procesamiento de proteínas relacionadas con la regulación de diversos procesos celulares, incluida la expresión génica. La cianobacteria *Synechocystis* PCC6803 presenta cuatro homólogos FtsH, denominados FtsH1-4, de los cuales FtsH1 y FtsH3 son esenciales (123). Estudios anteriores indican que estas proteasas podrían actuar en forma de complejos: FtsH4 se encontraría exclusivamente en forma homo-complejos, mientras que FtsH3 estaría formando heterocomplejos con FtsH2 y FtsH1 de forma independiente, además de formar potenciales homo-complejos (124).

El complejo hexamérico FtsH2/3, localizado en la membrana tilacoidal, ejerce la función de las proteínas FtsH más extendida en cianobacterias y cloroplastos de plantas superiores, consistente en la degradación del polipéptido D1 del centro de reacción fotosintético y el control general de calidad de PSII (124,125). FtsH2 también tiene un rol en la regulación de los niveles celulares de glucosil-glicerol fosfato sintasa, enzima relacionada con la osmoprotección (126), así como en la adaptación a condiciones de deficiencia de carbono mediante la degradación del represor transcripcional NdhR (127). La proteasa FtsH2 actuaría de forma directa (aunque todavía no se descarta una posible acción indirecta) sobre éste, causando su degradación y permitiendo la transcripción de genes del operón del mecanismo de concentración de CO₂ cuya expresión reprime.

Por otro lado, el complejo FtsH1/3 se localiza en la membrana citoplásmica y está implicado en la regulación de la respuesta a deficiencia de hierro, por medio de la degradación de Fur, homólogo de FurA en *Synechocystis* PCC6803. En ausencia de FtsH1 o FtsH3, esta cianobacteria es incapaz de iniciar la expresión de proteínas encargadas de la respuesta a la deficiencia de hierro, pese a la correcta regulación de los niveles de expresión de Fur, indicando que estas proteasas constituyen un nivel de regulación superior. Fur ha sido detectada en la membrana citoplasmática de *Synechocystis* PCC6803, acumulándose en ella en condiciones de deficiencia de hierro en mutantes que expresan menor cantidad de FtsH1 y/o FtsH3. Dada la localización del complejo FtsH1/3 en la membrana citoplasmática, tras la liberación de Fur del DNA ésta podría estar accesible a la proteólisis (128,129). De esta forma, la degradación del represor transcripcional podría estar desplazando el equilibrio hacia su disociación de los promotores que regula, favoreciendo así la transcripción de genes de respuesta a deficiencia de hierro (128).

Finalmente, recientemente se ha publicado que el complejo FtsH1/3 está implicado en la homeostasis de carbono y fosfato, mediante la degradación de los represores transcripcionales NdhR (al igual que FtsH2) y PhoU, respectivamente. También parece tener un rol en la homeostasis de nitrógeno, afectando de forma indirecta al activador NtcA favoreciendo la fosforilación de la proteína P_{II}, necesaria para la inducción de su regulón (129).

Los ejemplos incluidos a lo largo de este apartado muestran cómo la regulación mediante proteólisis constituye otro mecanismo regulatorio relevante en procariotas, frecuentemente como un nivel adicional de regulación de la transcripción génica sobre distintas proteínas, descrito también para proteínas pertenecientes a la superfamilia FUR como PerR en *B. subtilis* y Fur en *Synechocystis* PCC6803 (128,130).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a estudios previos acerca de las interacciones entre los parálogos Fur de *Anabaena* PCC7120, el presente trabajo parte de la hipótesis de que FurB y FurC podrían estar interaccionando *in vivo*, con consecuencias sobre sus respectivas funciones. A fin de profundizar en el estudio de esta interacción y el conocimiento acerca de la acción de estas proteínas, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Realización de una revisión bibliográfica acerca del impacto de las interacciones proteicas sobre la regulación transcripcional, así como de diferentes metodologías de estudio de interacciones proteicas *in vivo*.
2. Revisión de casos de regulación por proteólisis de proteínas asociadas a membrana descritos en la literatura.
3. Análisis de la influencia de la presencia de FurC sobre la actividad de FurB como regulador transcripcional mediante ensayos de retardo en gel, así como el efecto de la presencia de FurB sobre la actividad de FurC.
4. Detección de las formas oligoméricas de FurB y FurC *in vivo* en extractos de distintas cepas de *Anabaena* PCC7120, tanto *wild-type* como cepas modificadas genéticamente, mediante Western blot, a fin de determinar la presencia de hetero-oligómeros FurB/FurC *in vivo*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

4.1.1. Cepas de cianobacterias empleadas

Los ensayos realizados en el presente trabajo incluyeron, además de la cepa *wild-type* de *Anabaena* PCC7120, diversas cepas mutantes generadas anteriormente: cepa de sobreexpresión de FurC (131), cepa de sobreexpresión de FurB (40) y cepa de delección de FurB (39). La cepa *wild-type* (WT) procede de la Colección de Cultivos de Cianobacterias del Instituto Pasteur, y es la cepa a partir de la cual las diferentes variantes han sido desarrolladas.

La cepa de sobreexpresión de FurB, también denominada VSC2770, contiene el vector pAM2770_{zur}, que sobreexpresa FurB y aporta resistencia a neomicina. De forma similar, la cepa de sobreexpresión de FurC o EB2770, contiene el vector pAM2770_{furC}. En cada caso, el genes correspondiente a FurB o FurC se incorporó al plásmido pAM2770 bajo el control del promotor inducible del gen de la plastocianina (*petE*), inducible por cobre (132). Previamente se había observado que la concentración de cobre presente en el medio BG11 empleado en los cultivos de cianobacterias era suficiente para la

sobreexpresión de los genes regulados por este promotor, por lo que no se suplementó el medio con cobre adicional para la inducción de su expresión (133).

Por otro lado, el mutante de delección se generó mediante delección-inserción del gen *all2473* (*furB* o *zur*), confiriendo adicionalmente resistencia a estreptomicina y espectinomicina.

4.1.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en medio BG11 1x suplementado con 1 mL/L de suplemento 1000x (134). La composición de este medio es de 16 μM NaNO_3 , 8.8 μM NaHCO_3 , 0.2 μM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 0.25 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.3 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0.2 μM NaCO_3 , mientras que la del suplemento 1000x es de 30 μM citrato férrico de amonio, 30 μM ácido cítrico, 190 μM EDTA, 46 μM H_3BO_3 , 9.15 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.77 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.61 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.32 μM $\text{CuSO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y 0.17 μM CoCl_2 . Tanto el medio de cultivo como el suplemento se prepararon sobre una base de agua destilada y se esterilizaron mediante autoclave previo uso. El suplemento se conservó en oscuridad a 4°C.

Los cultivos destinados a la recogida de biomasa para los experimentos de Western Blot se realizaron en un escalado a dos etapas, a fin de alcanzar una densidad celular suficiente en un menor tiempo y de forma controlada: cultivos de iniciación en 20 mL y cultivos de ensayo en 100 mL. Los cultivos de iniciación se inocularon a partir de cultivos de mantenimiento en matraces Roux de 1 L de capacidad y en burbujeo estéril (filtrado con un filtro de 0.22 μm), mantenidos a 25-30°C y 20 $\mu\text{mol}/\text{sec} \cdot \text{m}^2$ de fotones.

En primer lugar, la densidad óptica de los cultivos de iniciación se valoró espectrofotométricamente a 750 nm ($\text{DO}_{750\text{nm}}$) a fin de inocular para cada cepa una $\text{DO}_{750\text{nm}} = 0.4$ en un volumen final de 20 mL de medio BG11. En el caso de los mutantes, se añadieron los correspondientes antibióticos: neomicina a concentración final 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los mutantes de sobreexpresión y espectinomicina y estreptomicina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el mutante de delección de FurB. Estos cultivos se incubaron a 28°C, en agitación a 150 rpm y bajo una iluminación de 10 $\mu\text{mol}/\text{sec} \cdot \text{m}^2$ de fotones.

Una vez estos cultivos alcanzaron la fase estacionaria ($\text{DO}_{750\text{nm}} = 1$), se emplearon para la inoculación de los cultivos de ensayo a $\text{DO}_{750\text{nm}} = 0.2$, por duplicado, que se incubaron en un incubador *Innova 43 Incubator Shaker* a 28°C, en agitación a 150 rpm y bajo una iluminación de 20 $\mu\text{mol}/\text{sec} \cdot \text{m}^2$ de fotones. La biomasa se recogió para cada cultivo al alcanzar una $\text{DO}_{750\text{nm}} = 0.9 - 1$.

La valoración de la densidad celular del cultivo se realizó por medio de conteo al microscopio óptico en cámara de Neubauer con 10 µL de muestra tras una dilución 1:4. Se contó el número de células totales en cuatro cuadrantes, dos superiores y dos inferiores, determinando la densidad celular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{densidad celular} \left(\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \frac{n}{4} \cdot 10^4 \cdot f$$

siendo n el número total de células contadas y f el factor de dilución, en este caso 4.

4.2. Recogida de biomasa celular

Para cada cultivo se recogieron muestras para la obtención de fracciones celulares (proteína soluble o membranas), manteniendo 1 mL destinado al conteo celular. Se transfirieron en fracciones de 30 mL de cultivo a tubos Falcon, que se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm y temperatura ambiente en una centrífuga *Allegra X 30R*. Tras descartar el sobrenadante hasta dejar únicamente 5 mL de cultivo en cada caso, se repartió el volumen restante en alícuotas de 1 mL, que se centrifugaron 10 minutos a 14000 rpm y 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y se almacenaron los pellets a -80°C.

4.2.1. Preparación de muestras de proteína soluble

Para la obtención de muestras de proteína soluble se resuspendieron las fracciones almacenadas en 500 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8 con 5 µL PMSF 100x (1 mM) y se sometieron a 7 ciclos de sonicación (45 segundos de sonicación seguidos de 30 segundos de descanso) a amplitud 9 en un sonicador *UP 200S Dr. Hielscher*. A continuación, se centrifugaron 10 minutos a 14000 rpm y 4°C en una centrífuga *Allegra X 30R* y se tomó el sobrenadante, descartando el pellet.

4.2.2. Preparación de muestras de proteína de membrana

Las muestras de proteínas de membrana se obtuvieron a partir de pellets celulares resuspendidos en 100 µL de solución A, de composición 10 mM Tricina/KOH a pH 7.8, 0.5 M Sacarosa, 10 mM MgCl₂ · 6 H₂O y 2.5 mM Na₂HPO₄. Después se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga *Allegra X 30R*. Tras descartar el sobrenadante, se resuspendieron las muestras en 100 µL de solución A y lisozima 1 mg/mL. Tras incubar 1 h a 35°C a 90 rpm en una incubadora *P Selecta*, se centrifugaron a 1450 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se descartó de nuevo y se resuspendió cada pellet en 100 µL de solución A.

4.3. Técnicas analíticas de proteínas

4.3.1. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.3.1.1. Preparación de geles para SDS-PAGE

Los geles empleados constaron de una región de 5% de acrilamina/bisacrilamida como gel concentrador, que asegura un frente recto e igualado en todos los pocillos y la movilidad simultánea de todas las proteínas de la muestra, seguida de otra región de 17% acrilamida/bisacrilamida como gel separador. La concentración de cada región queda detallada en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los geles SDS-PAGE concentradores y separadores

<i>Componente</i>	<i>Gel separador 17%</i>	<i>Gel concentrador 5%</i>
<i>H₂O</i>	0.36 mL	1.4 mL
<i>Tris-HCl 1.5 M pH 8.8</i>	2.24 mL	-
<i>Tris-HCl 0.5 M pH 6.8</i>	-	0.25 mL
<i>Acrilamida/Bisacrilamida 30%</i>	3.4 mL	0.33 mL
<i>SDS 10%</i>	30 µL	10 µL
<i>Persulfato amónico 10%</i>	20 µL	10 µL
<i>TEMED</i>	10 µL	10 µL

4.3.1.2. Preparación de las muestras

Las muestras de proteína soluble a cargar en el gel se prepararon a un volumen final de 20 µL, mientras que para las muestras de proteína de membrana se emplearon 80 µL por carril, para asegurar que no se toman restos de membranas al cargar en el pocillo.

La cantidad de muestra a cargar en el gel se normalizó entre cepas mediante la adición del tampón correspondiente, a fin de cargar un volumen correspondiente a una cantidad equivalente de células por carril para cada tipo de muestra. No se normalizó a cantidad de proteína, ya que se ha observado anteriormente en nuestro laboratorio que las distintas cepas presentan una diferente cantidad de proteína total por célula. Por tanto, de cargar en cada pocillo una cantidad igual de proteína no se apreciaría correctamente el cambio en el contenido relativo de cada una de las formas oligoméricas entre una cepa y otra.

A cada alícuota se añadió tampón de carga 5x con o sin β-mercaptoetanol (20 µL para muestras de células completas o membranas y 5 µL para muestras de proteína) para una composición final en el pocillo de 50 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% v/v glicerol y 0.02 % m/v azul de bromofenol, con 1% m/v β-mercaptoetanol. Todas las muestras se hirvieron a 95°C durante 5 minutos, tras lo cual se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga *Eppendorf 5427R*.

4.3.1.3. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE

En cada pocillo se cargaron 17.5 μ L de la muestra correspondiente, 5 μ L en el caso del marcador de pesos moleculares preteñido, empleándose *NZY Colour Marker Protein II* de NZYTech para los geles de proteína soluble y *Precision Plus Protein Standards Dual Colour* de Bio-Rad para los geles de proteína de membrana. Ambos se aplicaron a sus correspondientes pocillos como son suministrados comercialmente, sin tratamiento adicional. Se trata de mezclas de proteínas de diferentes pesos moleculares acopladas a cromóforos, que permiten su visualización sin necesidad de ningún tratamiento posterior y son, por tanto, adecuados para su uso en ensayos de Western Blot.

La electroforesis se realizó en un equipo *Mighty Small II SD250 / SE260* (Hoefer) suministrando 35 mA por gel, en tampón de SDS-PAGE de composición Tris 15 g/L, glicina 75 g/L, SDS 5 g/L y pH 8.7. El voltaje se mantuvo aproximadamente 45 minutos, hasta llegar el frente de azul de bromofenol al final del gel. La tinción de las proteínas presentes en los geles se realizó con una solución de azul de Coomassie durante 10 minutos, seguida de lavados con una solución decolorante para eliminar el exceso. La composición de la solución de azul de Coomassie es de 10 % v/v ácido acético, 45 % v/v metanol, 45 % agua y 0,25 % m/v Coomassie Blue R-250, mientras que la de la disolución decolorante es de 10 % v/v ácido acético, 25 % v/v metanol y 65 % v/v agua.

4.3.2. Western blot

4.3.2.1. Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis, se siguió un protocolo de Western Blot en sistema semiseco. Para ello, por cada gel a transferir se prepararon dos capas de papel de filtro y una membrana de PVDF *Immobilon-P transfer membrane* del tamaño correspondiente a las dimensiones del gel. La membrana fue activada mediante inmersión en metanol durante 10 segundos. Posteriormente, membrana, papeles de filtro y gel SDS-PAGE fueron sumergidos durante 2 minutos en tampón de transferencia, de composición 48 mM Tris-HCl pH 9.2, 39 mM glicina, 0.462 g/L SDS y 20% metanol. Las distintas capas se dispusieron en el equipo en el siguiente orden, de ánodo a cátodo: primer papel de filtro, membrana de PVDF, gel SDS-PAGE y segundo papel de filtro (Fig. 5).

Con cuidado de no introducir burbujas ni dañar el sistema, se eliminó el exceso de líquido por presión antes de cerrar el equipo y conectarlo a la fuente. El voltaje aplicado para la transferencia fue de 15 V durante 2 horas.

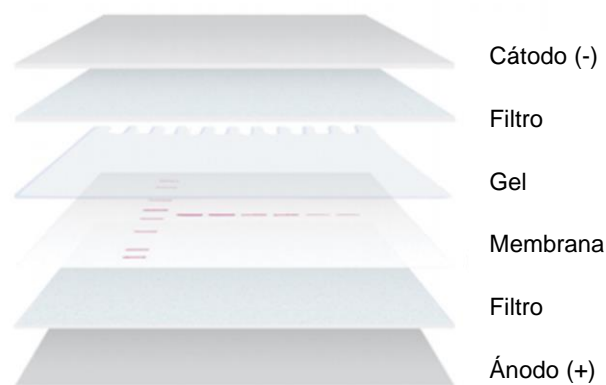


Fig. 5. Disposición de las distintas capas de materiales para la transferencia de proteínas de un gel a una membrana mediante electrotransferencia. Imagen tomada de BioRad y modificada para añadir la traducción al español de los componentes indicados.

Una vez finalizada la transferencia, se transfirió cada membrana de PVDF a una cubeta con solución de bloqueo: 2% leche descremada en TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.1 % v/v Tween 20). El bloqueo se mantuvo durante al menos 6 horas, O/N cuando fuera posible, en agitación a 100 rpm.

4.3.2.2. Revelado

Una vez finalizado el bloqueo, se sometió la membrana a 3 lavados de 5 minutos con 50 mL de TBS-T, tras lo cual se procedió a la incubación con el anticuerpo primario durante una hora. Según la proteína que se buscaba detectar en cada momento, se emplearon anticuerpos policlonales anti-FurB o anti-FurC a dilución 1:1000. Ambos anticuerpos fueron obtenidos en conejo. Tras la incubación, se realizaron 3 nuevos lavados de 5 minutos con 50 mL TBS-T, seguidos de incubación con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa y producido en cabra (Sigma A9162), a dilución 1:10000. Pasada una hora, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 50 mL TBS-T, seguidos de 2 lavados de 5 minutos con 50 mL tampón fosfocitrato, de composición 24.3 mM ácido cítrico, 5.14 mM Na_2HPO_4 y pH 5.3.

El paso final de revelado implica la preparación previa de la solución de color. Por cada membrana a revelar, se disolvieron 20 mg de TMB y 80 mg de DONS por separado en 1 mL de EtOH absoluto a 60°C. Una vez disueltos, se añadieron junto con 8 mL adicionales de EtOH a 30 mL de tampón fosfocitrato. Finalmente, se añadieron 15 μL de H_2O_2 a la mezcla e, inmediatamente después, se vertieron a un recipiente conteniendo la membrana. Una vez generado suficiente color y antes de alcanzar la saturación de color, se detuvo la reacción con agua destilada.

4.4. Ensayos de retardo en gel

La valoración de la afinidad *in vitro* de FurB y FurC a distintas secuencias promotoras se realizó mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA, del inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Esta técnica se basa en la formación de complejos DNA-proteína de mayor peso molecular que el DNA libre, con menor movilidad electroforética. La realización de estos ensayos implica, en primer lugar, la obtención de fragmentos de DNA conteniendo las regiones promotoras correspondientes, para luego realizar el ensayo EMSA.

4.4.1. Obtención de las regiones promotoras de los genes mediante PCR

Los promotores empleados para los ensayos EMSA se amplificaron mediante la técnica de PCR mediante un termociclador *Thermo Cycler 2720 (Applied Biosystems)*. Se emplearon cebadores diseñados para amplificar fragmentos de hasta 500 pb conteniendo el promotor de interés, entre 150 y 350 pares de bases *upstream* del ATG, empleando DNA genómico de *Anabaena* PCC7120 como molde. Estos cebadores se incluyen en la tabla S1 del Material Suplementario.

La mezcla de reacción por tubo fue de 5 µL Buffer 10x, 1.5 µL MgCl₂ 50 mM, 1 µL dNTPs 10 mM, 2.5 µL de cada cebador 10 mM, 0.5 µL de Taq Polimerasa 1 U/µL BIOTOOLS y 50 ng de DNA genómico de *Anabaena* PCC7120, a volumen total de 50 µL.

El programa de termociclador seguido se detalla en la tabla S2 del Material Suplementario. La temperatura de hibridación se modificó para cada par de cebadores, eligiendo una temperatura entre 2 y 4°C por debajo de la T_m más baja de la pareja y con un mínimo de 40°C a fin de evitar amplificaciones inespecíficas. El tiempo elegido para esta fase, de 30 segundos, se corresponde a una velocidad de amplificación esperada de 1 kb/s y a un tamaño medio de promotor de 500 pb.

La limpieza de los promotores amplificados para eliminar restos de cebadores, nucleótidos y enzimas se realizó mediante el uso de columnas *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Sigma Aldrich)* siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA obtenida se cuantificó mediante un equipo *NanoVue Plus™ (GE Healthcare)*, empleando como blanco agua Mili-Q y con un volumen de 3 µL por medida.

4.4.2. Preparación de geles para ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)

Los geles empleados fueron geles no desnaturizantes al 6% de acrilamida-bisacrilamida, cuya composición se detalla en la tabla 2. El tampón de electroforesis

empleado fue diluido desde un stock 5x de composición glicina 142 g/L, Tris 30,28 g/L y pH 8.5. Adicionalmente, en los casos indicados se añadió MnCl_2 a concentración final 100 μM en los geles y tampón de electroforesis

Tabla 2. Composición de un gel PAGE para EMSA

Componente	Gel separador 6%
H_2O	5.79 mL
Acrilamida / bisacrilamida 30%	2 mL
Tampón de electroforesis 10x	0,93 mL
Glicerol 50%	1.40 mL
PSA 10%	50 μL
TEMED	30 μL

4.4.3. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Los pocillos de los geles se limpiaron manualmente mediante inyección de tampón de electroforesis a presión, con cuidado de no dañarlos, antes de precorrer a 60 V durante al menos 30 minutos a 4°C para equilibrar el sistema y desplazar posibles restos de poliacrilamida o PSA en el pocillo, que podrían interferir en la interacción DNA-proteína. Las muestras de incubación se prepararon con 50 ng del promotor de interés, 50 ng del promotor competidor, tampón de unión 10x, BSA 1 mg/mL y DTT 20 mM para una composición final de la mezcla de reacción de 10 mM Bis-Tris pH 7.5, 40 mM KCl, 5% v/v glicerol, 0.05 mg/ml de BSA y 1 mM DTT.

La determinación de especificidad de unión requiere de la incubación en presencia de DNA competidor, en este caso el fragmento interno del gen *pkn22* de *Anabaena* PCC7120 (*ifpkn22*), de forma que si se observara unión a este fragmento no se pudiera considerar la unión a cualquier otro DNA del carril como un efecto específico. Como metales correguladores de FurB y FurC, se adicionó ZnSO_4 y MnCl_2 a concentración final de 5 μM y 100 μM , respectivamente. La concentración de proteína añadida fue del rango de nanomolar, y en todo caso se adicionó en último lugar a la mezcla.

Tras una incubación de 30 minutos, se añadieron 3 μL de tampón de carga (composición final 1x igual a la del tampón de unión, con un 50% de glicerol y 0.0025 % m/v de azul de bromofenol). Tras limpiar los pocillos de nuevo, se cargó un total de 18 μL por pocillo y se realizó la electroforesis a 90 V durante 110 minutos.

El revelado se llevó a cabo con 5 μL de *SYBR Safe Fluorescent Dye* 10000x (Invitrogen) disueltos en 50 mL del tampón de electroforesis, dejando el gel en agitación suave en esta disolución durante 10 minutos en oscuridad. La visualización de los ácidos nucleicos teñidos se realizó en un dispositivo *Gel Doc 2000* (BioRad).

5. RESULTADOS

5.1. Estudio del efecto de la interacción entre FurB y FurC sobre su función fisiológica

Dados los resultados previos apuntando hacia una posible interacción entre FurB y FurC, se decidió estudiar el efecto de la presencia de una u otra proteína sobre su función individual. La función principal de las proteínas Fur consiste en la regulación transcripcional, por ello, se realizaron ensayos de retardo en gel (EMSAs), que permiten valorar la unión de una proteína a un promotor según la formación de un complejo DNA-proteína de migración retardada respecto al DNA libre. Si en presencia de una proteína adicional se produce una variación en el retardo de la movilidad electroforética producido por FurB o FurC sobre promotores de genes que regulan, esto indicaría que la potencial interacción entre FurB y FurC podría tener consecuencias funcionales.

Para excluir la posibilidad de que el efecto fuese inespecífico se añadió el regulador transcripcional HrsA de *Helicobacter pylori* (gen *hp1043*)(135) a una mezcla de incubación con el promotor de un gen regulado por uno de los dos parálogos Fur en lugar del otro parálogo Fur correspondiente.

Los ensayos EMSA se realizaron en presencia de cinc y manganeso como metales coreguladores para FurB y FurC, respectivamente, a fin de asegurar su funcionalidad. El manganeso se empleó en sustitución del hierro (coregulador fisiológico de FurC) por ser equivalente, pero tener menor propensión a la precipitación, siendo así más adecuado para ensayos *in vitro*.

5.1.1. Efecto de la presencia de FurC sobre la unión de FurB a promotores de genes que regula

Los genes *sodA* (*all0070*) y *catA* (*alr0998*) de *Anabaena* PCC7120 fueron seleccionados como genes diana regulados por FurB para valorar el efecto de la adición de FurC sobre la capacidad de unión de FurB a sus secuencias diana. El primero de estos genes, *sodA*, codifica para la Mn-superóxido dismutasa A, mientras que *catA* corresponde a la Mn-catalasa A, siendo ambos genes relacionados con la defensa ante estrés oxidativo a cuyos promotores FurB es capaz de unirse de forma específica *in vitro*, y cuya expresión se ve reprimida a consecuencia de su unión (34).

Además del control de HrsA, se realizó un control positivo de la actividad de FurC consistente en una mezcla de incubación de FurC con el promotor del gen *prxA* (*alr4641*) de *Anabaena* PCC7120, que codifica para la peroxirredoxina A, diana directa descrita de este regulador transcripcional (35). La figura 6 muestra los resultados obtenidos para

la unión de FurB al promotor del gen *sodA* en ausencia o presencia de FurC, a una concentración de FurB de 800 nM.

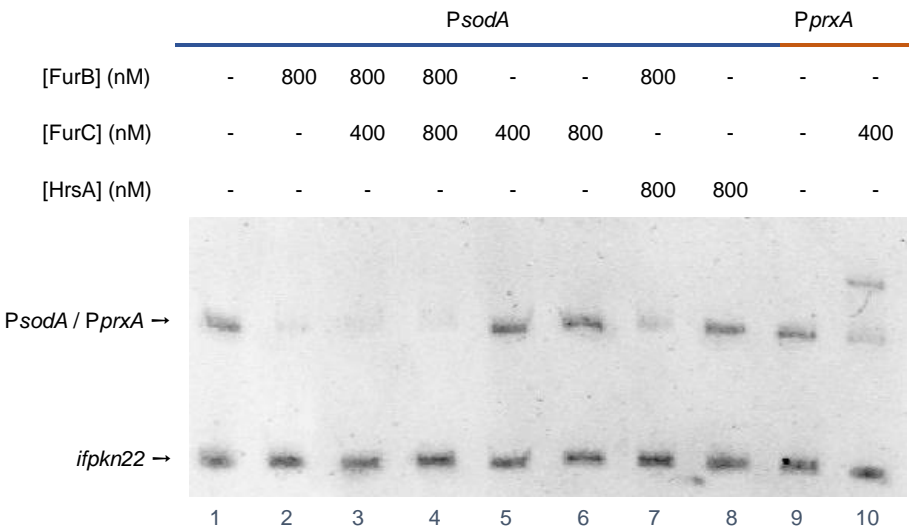


Fig. 6. Ensayo de retardo en gel para la valoración de la interacción de FurB 800 nM con el promotor del gen *sodA* (carriles 1-8) en presencia o ausencia de FurC, o HrsA como control negativo. Los carriles 9 y 10 se corresponden al control positivo de interacción de FurC con el promotor del gen *prxA*.

Los resultados mostrados en la figura 6 indican que la presencia de FurC (carriles 3 y 4) no altera el retardo que produce FurB con el promotor de *sodA*. Estos resultados indican que FurC no estaría impidiendo o reduciendo la unión de FurB a *PsodA in vitro*. Sin embargo, ya que el retardo del promotor es completo, no permite observar un potencial efecto potenciador sobre la unión, por lo cual se procedió a realizar un nuevo ensayo a menor concentración de FurB, 500 nM, y manteniendo la ratio de concentración entre FurC y FurB tanto a 1:2 como 1:1. Los resultados de este ensayo quedan recogidos en la figura 7.

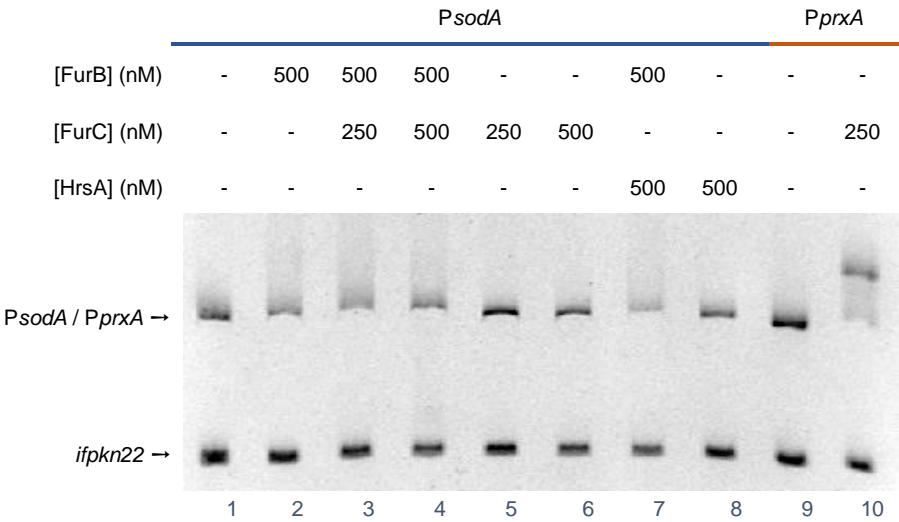


Fig. 7. Ensayo de retardo en gel para la valoración de la interacción de FurB 500 nM con el promotor del gen *sodA* (carriles 1-8) en presencia o ausencia de FurC, o HrsA como control negativo. Los carriles 9 y 10 se corresponden al control positivo de interacción de FurC con el promotor del gen *prxA*.

En la figura 7 se puede observar que parte del promotor incluido permanece libre, sin formar complejo con FurB (carriles 2, 3 y 4). De nuevo, el retardo del promotor de *sodA* en presencia de FurB se mantiene inalterado independientemente de la presencia de FurC en las condiciones ensayadas. Por tanto, FurC no muestra tener un efecto ni activador ni inhibidor sobre la unión de FurB al promotor de *sodA*.

A continuación, se realizó el ensayo equivalente para la interacción de FurB a concentración 800 nM con el promotor de *catA*, cuyos resultados quedan representados en la figura 8.

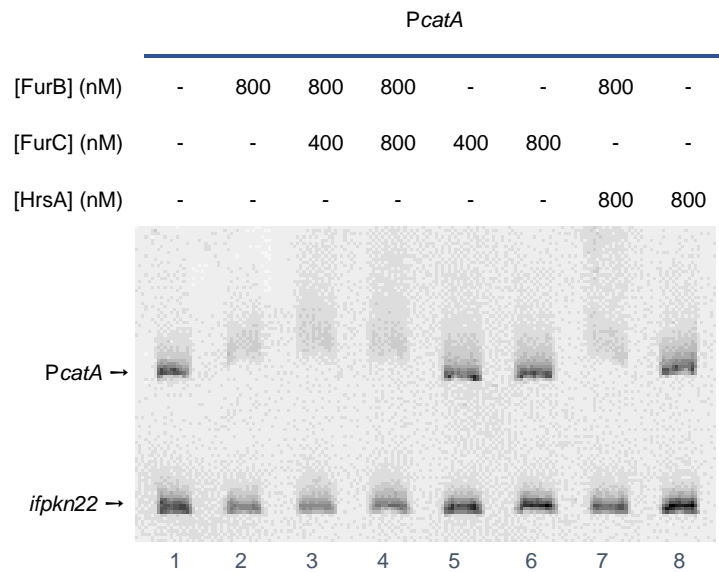


Fig. 8. Ensayo de retardo en gel para la valoración de la interacción de FurB 800 nM con el promotor del gen *catA* en presencia o ausencia de FurC, o HrsA como control negativo.

Los resultados obtenidos para el promotor de *catA* son similares a los observados con el promotor de *sodA*, observándose una migración retardada del promotor en presencia de FurB (Fig. 8 - carriles 2, 3, 4 y 7) con respecto al promotor libre (Fig. 8 - carril 1), independientemente de la presencia de FurC a cualquiera de las concentraciones ensayadas, por lo que FurC no estaría mostrando un efecto inhibidor sobre la unión de FurB al promotor de *catA*.

Al igual que en caso de *PsodA*, el presente ensayo no permite observar un potencial efecto positivo, ya que la concentración de FurB es suficiente para provocar el retardo de la totalidad del promotor empleado, por lo que se realizó un ensayo a una concentración 500 nM de FurB. Los resultados obtenidos en este caso quedan recogidos a continuación en la figura 9.

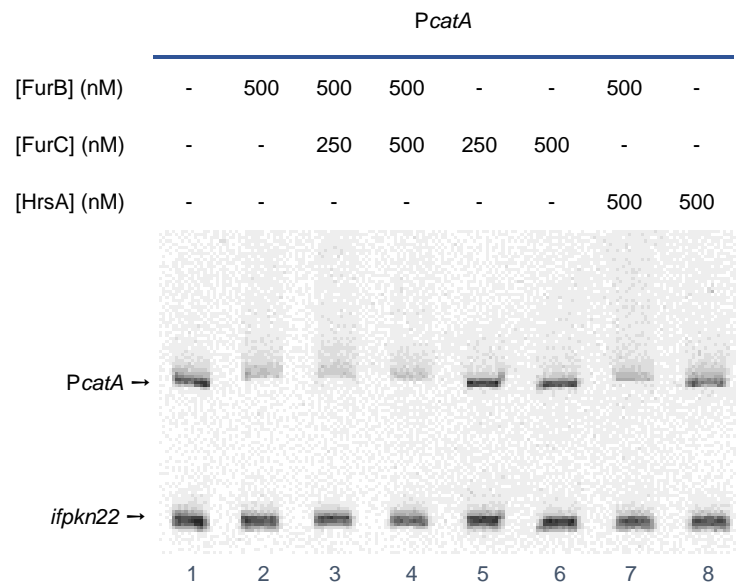


Fig. 9. Ensayo de retardo en gel para la valoración de la interacción de FurB 500 nM con el promotor del gen *catA* en presencia o ausencia de FurC, o HrsA como control negativo.

Como se muestra en la figura 9, el retardo de FurB con el promotor de *catA* tampoco se vio alterado por la presencia de FurC, quedando la misma cantidad de promotor libre en cada caso (Fig. 9 – carriles 2, 3 y 4), por lo que se concluye que FurC tampoco ejerce un efecto activador sobre la unión de FurB al promotor de *catA*.

En conclusión, los ensayos EMSA realizados sugieren que FurC no tiene un efecto inhibitor ni potenciador sobre la capacidad de unión *in vitro* de FurB a los promotores de genes que regula. De haber interacción entre FurC y FurB, no estaría modificando la capacidad de unión al DNA de FurB al menos *in vitro* y en las condiciones de ensayo probadas en este trabajo.

5.1.2. Efecto de FurB sobre la unión de FurC a promotores de genes que regula

El gen *hetZ* (*alr0099*) de *Anabaena* PCC 7120 fue elegido para el EMSA de valoración del efecto de FurB sobre la unión de FurC *in vitro* a promotores de genes cuya expresión regula. Se trata de un gen que codifica para HetZ, un regulador transcripcional esencial para la diferenciación a heterocistos (136) identificado como diana cuya expresión se ve regulada por FurC (43).

En esta ocasión se emplearon tanto geles como tampón de electroforesis con $MnCl_2$ a concentración final 100 μM ya que son las condiciones óptimas para observar el retardo de FurC con este tipo de promotores. Los resultados obtenidos en estas condiciones fueron los incluidos en la figura 10.

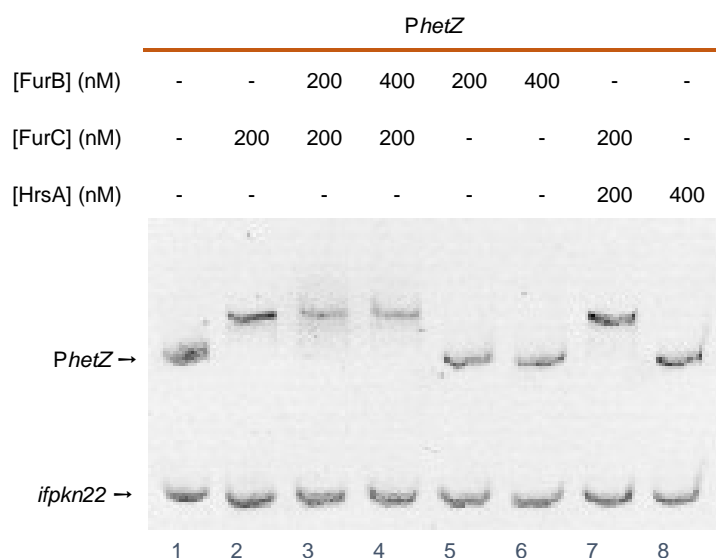


Fig. 10. Ensayo de retardo en gel para la valoración de la interacción de FurC con el promotor del gen *hetZ* en presencia o ausencia de FurB, o HrsA como control negativo.

El retardo de la migración del promotor de *hetZ* en presencia de FurC (carriles 2, 3, 4 y 7 de la Fig. 10) se puede observar en la formación de una banda a diferente altura que el DNA libre (carril 1), como era de esperar. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en los ensayos anteriores, la presencia de FurB muestra tener un efecto potenciador sobre el retardo del promotor, observándose bandas más tenues (carriles 3 y 4) compatibles con la formación de un complejo incluyendo FurB, FurC y el promotor de *hetZ*. Dado que esto no se observa para el control con HrsA (carril 7), no se trata de un efecto inespecífico.

5.2. Análisis de la presencia de hetero-oligómeros de FurC y FurB *in vivo*

A fin de determinar la presencia *in vivo* de hetero-oligómeros de FurC y FurB en muestras de cultivos de *Anabaena* PCC7120, se realizaron ensayos de Western Blot sobre distintas fracciones con un anticuerpo policlonal anti-FurB y anti-FurC de forma independiente. Las fracciones analizadas fueron tanto de proteína soluble como de membrana. Además, estos experimentos se llevaron a cabo en condiciones no reductoras y reductoras, dada la potencial implicación de residuos susceptibles a la reducción en las interacciones entre proteínas.

Se analizaron muestras de diferentes cepas disponibles en nuestro laboratorio: *wild-type* (WT), cepa de sobreexpresión de FurB (\uparrow B), cepa de delección de FurB (Δ B) y cepa de sobreexpresión de FurC (\uparrow C). En cada ocasión se cargó en cada pocillo una cantidad de proteína proporcional a un número de células equivalente, de aproximadamente 10^7 células de *Anabaena* PCC7120 por cada pocillo. Esta normalización a cantidad de células en lugar de a cantidad de proteína se debe a las diferencias en proteína total de las distintas cepas.

Previamente en nuestro laboratorio se había comprobado la especificidad del anticuerpo policlonal anti-FurC empleado en el presente trabajo, por lo que se procedió a valorar la potencial reactividad cruzada del anticuerpo policlonal anti-FurB sobre una muestra de FurC purificada. Estos controles de inespecificidad revelaron que los anticuerpos primarios eran específicos de sus proteínas dianas y no mostraban reactividad cruzada entre estos dos parálogos Fur.

5.2.1. Análisis de la presencia de hetero-oligómeros (FurB/FurC) en la fracción soluble

5.2.1.1. Resultados obtenidos en condiciones no reductoras

Los resultados obtenidos para las cepas WT, de sobreexpresión de FurB y de delección de FurB realizados en condiciones no reductoras se muestran en la figura 11.

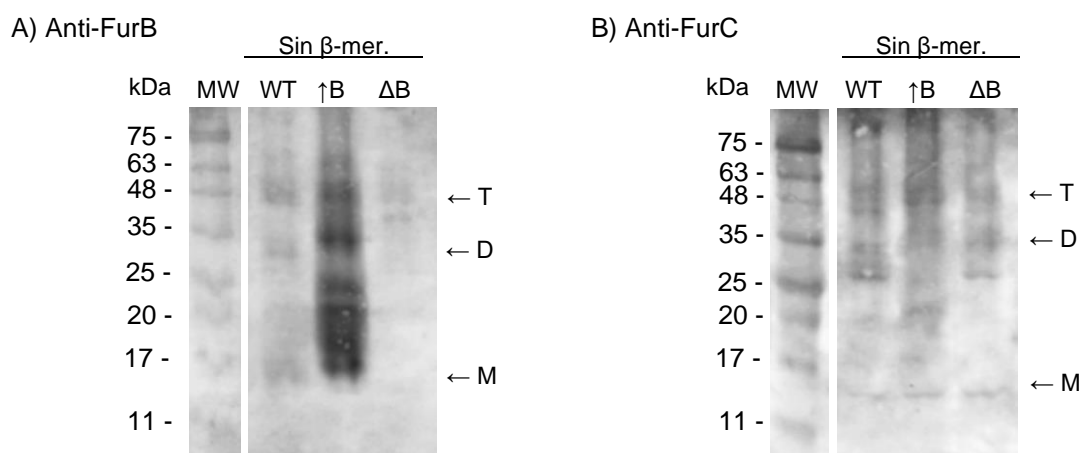


Fig. 11. Membranas de Western blot, para muestras de proteína soluble tratadas con tampón de carga no reductor correspondientes a las cepas *wild-type* (WT), de sobreexpresión de FurB (↑B) o de delección de FurB (ΔB). A) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal anti-FurB. B) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal anti-FurC. MW: marcador de pesos moleculares. Marcadas en cada caso con M, D y T respectivamente las zonas cuyas bandas se corresponden a monómeros, dímeros o trímeros, respectivamente.

La figura 11A permite observar que FurB presenta tres formas en las cepas WT y de sobreexpresión de FurB: el monómero de 15 kDa, el dímero de 30 kDa y el trímero de 45 kDa, aproximadamente. La banda del dímero se corresponde a un peso molecular ligeramente superior al observado para la cepa WT por razones desconocidas.

Respecto a las formas de FurC, se pueden observar en la figura 11B bandas a 14 kDa en las tres cepas, inferior al peso molecular del monómero, de 17.2 kDa. Esto estaría indicando la posibilidad de que FurC esté siendo proteolizada. También se observan bandas compatibles con dímeros y trímeros de esta proteína.

Al comparar ambas figuras, se observa una banda compatible con heterodímeros en muestras de la cepa WT al revelar con ambos anticuerpos, con un peso molecular de unos 32 KDa. Sin embargo, ya que se observa en la cepa de delección de FurB al revelar con el anticuerpo anti-FurC, se descarta que se trate de un heterodímero. Además, si

se tratase de un heterodímero, se esperaría observar un aumento de la banda de dímero en la cepa de sobreexpresión de FurB, lo cual se observa al revelar con el anticuerpo anti-FurB pero no con anti-FurC.

Por último, existen bandas en ambas figuras compatibles con la masa molecular de heterotrímeros. Sin embargo, parece tratarse de bandas inespecíficas, ya que también aparecen al revelar con anti-FurB sobre la muestra de la cepa de delección de FurB.

5.2.1.2. Resultados obtenidos en condiciones reductoras

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de las cepas WT, de sobreexpresión de FurB y de delección de FurB tratadas con tampón de carga reductor con β -mercaptoetanol fueron los indicados a continuación en las figuras 12A (revelado con anticuerpo policlonal anti-FurB) y 12B (revelado con anticuerpo policlonal anti-FurC).

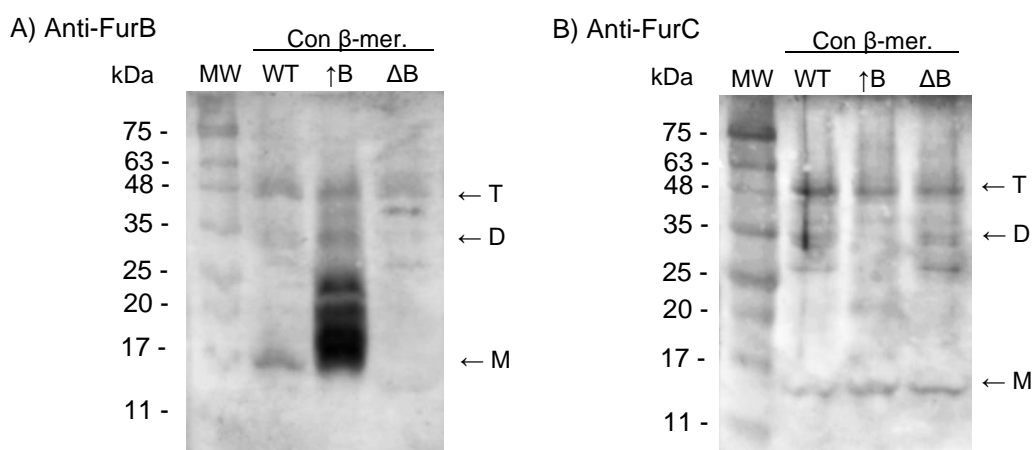


Fig. 12. Membranas de Western blot para muestras de proteína soluble tratadas con tampón de carga reductor correspondientes a la cepa *wild-type* (WT), de sobreexpresión de FurB (\uparrow B) o de delección de FurB (Δ B). A) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal contra FurB. B) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal contra FurC. MW: marcador de pesos moleculares. Marcadas en cada caso con M, D y T respectivamente las zonas cuyas bandas se corresponden a monómeros, dímeros o trímeros, respectivamente.

La figura 12 muestra patrones de bandas similares a los observados para condiciones no reductoras (Fig. 11). En el caso del revelado con el anticuerpo anti-FurB, se observa una disminución de la intensidad de las bandas de alto peso molecular, aumentando así la proporción de monómero. Previsiblemente, esto se debería a la reducción de puentes disulfuro implicados en el mantenimiento de las formas oligoméricas de FurB.

Las bandas correspondientes a dímeros observadas para FurB en el mutante de sobreexpresión de FurB no están presentes al revelar con el anticuerpo anti-FurC, mientras que las correspondientes a dímeros observadas para FurC se mantienen en el mutante de delección de FurB. Por tanto, no se pueden considerar heterodímeros. Respecto al posible trímero, se observa de forma similar en las cepas WT y Δ FurB al

revelar con anticuerpo anti-FurB, lo que de nuevo sugiere que se trata de una proteína reconocida inespecíficamente.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos sobre proteína soluble apuntan a que FurB está presente como monómero soluble a su masa molecular esperada de 15 kDa, mientras que el monómero de FurC se encuentra a unos 13-14 kDa y podría estar sufriendo proteólisis. Por otro lado, los resultados no apoyan la existencia de un heterodímero FurB/FurC, sino que las bandas correspondientes a dímeros probablemente sean homodímeros.

5.2.2. Análisis de la presencia de hetero-oligómeros (FurB/FurC) en la fracción de membrana

La localización en membrana es un mecanismo de regulación descrito en múltiples organismos procariotas (Introducción - Apartado 2.7), incluyendo la proteína Fur en *Synechocystis* PCC6803. Por tanto, ya que los resultados anteriores no permitieron la visualización de hetero-oligómeros en proteína soluble, se valoró la posibilidad de que éstos se encontraran en asociación a membranas. Se analizaron por Western blot muestras de proteínas de membrana para distintas cepas de *Anabaena* PCC7120, tanto con anticuerpos anti-FurB como anti-FurC, en condiciones reductoras y no reductoras.

5.2.2.1. Resultados obtenidos en condiciones no reductoras

Los resultados al analizar muestras de las cepas WT, de sobreexpresión de FurB, de delección de FurB y de sobreexpresión de FurC, tratadas con tampón de carga sin β -mercaptoetanol, fueron los indicados a continuación en la figura 13.

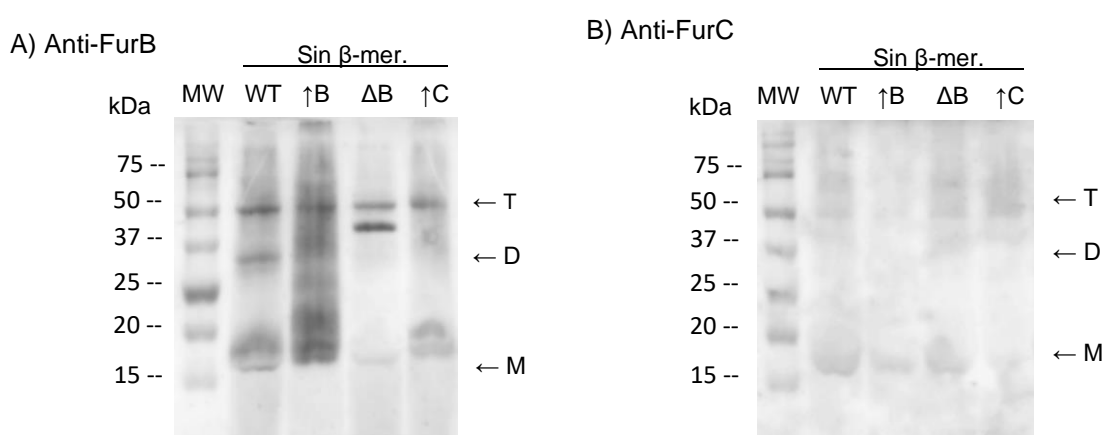


Fig. 13. Membranas de Western blot para muestras de proteínas de membrana tratadas con tampón de carga no reductor correspondientes a las cepas *wild-type* (WT), de sobreexpresión de FurB (↑B), de delección de FurB (ΔB) o de sobreexpresión de FurC (↑C). A) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal anti-FurB. B) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal anti-FurC. MW: marcador de pesos moleculares. Marcadas en cada caso con M, D y T respectivamente las zonas cuyas bandas se corresponden a monómeros, dímeros o trímeros, respectivamente.

Sorprendentemente, las bandas observadas en la figura 13A presentan una alta intensidad para las cuatro cepas, incluida la cepa *wild-type*, lo que estaría indicando una fuerte presencia de FurB en las membranas de *Anabaena* PCC7120. Dado que se buscó cargar en cada carril una cantidad de proteína equivalente en todos los ensayos, la comparación con los resultados obtenidos para fracción soluble (Fig. 11) indicaría que FurB se encuentra en mayor medida localizada en membrana en *Anabaena* PCC7120 *wild-type*.

Por otro lado, interesantemente, las bandas correspondientes a monómeros de FurB observadas en membranas (Fig. 13A) se corresponden a un peso molecular superior al esperado de 15.1 kDa, alcanzando los 18-19 kDa. Una posible explicación a esto sería que FurB se encuentre unida covalentemente a un linker de unión a membrana, o a un fragmento de uno.

Al igual que en el caso de proteína soluble (Fig. 11A y Fig. 12A), al revelar con el anticuerpo anti-FurB se observan bandas en la cepa de delección de FurB a 42 kDa y 50 kDa aproximadamente. La banda observada a 50 kDa indicaría que los potenciales trímeros observados en el resto de cepas podrían de nuevo tratarse de proteínas reconocidas inespecíficamente.

Los resultados obtenidos para el revelado con el anticuerpo monoclonal anti-FurC, incluidos en la figura 13B, permiten observar bandas tenues a unos 17 kDa, peso molecular del monómero de FurC. Su baja intensidad estaría indicando una baja presencia de FurC en membranas.

Comparando las figuras 13A y 13B, no se observa la presencia de bandas compatibles con oligómeros FurB-FurC en la fracción de membrana, al igual que ocurría en la fracción soluble.

5.2.2.2. Resultados en condiciones reductoras

La figura 14 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de Western Blot sobre muestras de las cepas WT, de sobreexpresión de FurB, de delección de FurB y de sobreexpresión de FurC. Todas fueron tratadas con tampón de carga con el agente reductor β -mercaptoetanol, y las membranas fueron reveladas con el anticuerpo policlonal anti-FurB (Fig. 14A) o anti-FurC (Fig. 14B).

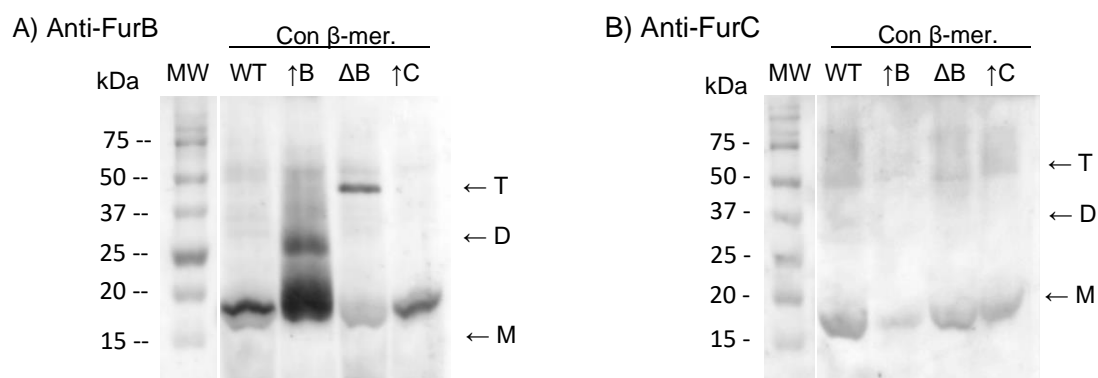


Fig. 14. Membranas de Western blot para muestras de proteínas de membrana tratadas con tampón de carga reductor correspondientes a las cepas *wild-type* (WT), de sobreexpresión de FurB ($\uparrow B$), de delección de FurB (ΔB) o de sobreexpresión de FurC ($\uparrow C$). A) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal anti-FurB. B) Membrana revelada con un anticuerpo policlonal anti-FurC. MW: marcador de pesos moleculares. Marcadas en cada caso con M, D y T respectivamente las zonas cuyas bandas se corresponden a monómeros, dímeros o trímeros, respectivamente.

De forma similar a lo observado para proteína soluble (Fig. 13), el tratamiento con un tampón de carga reductor genera bandas correspondientes a monómeros de FurB más intensas, en esta ocasión a 18-19 kDa, mientras la presencia de oligómeros es menor, probablemente debido a su disociación en monómeros a consecuencia de la reducción. Estos resultados reafirman la abundante presencia de FurB en la fracción de proteína de membrana incluso en la cepa WT.

Respecto a FurC, los resultados son similares a los obtenidos en condiciones no reductoras (Fig. 13B), con la diferencia de que las bandas de monómero presentan una intensidad mayor a consecuencia de la reducción de complejos de alto peso molecular.

De forma general para proteína de membrana, aunque no se observa gran cantidad de FurC, sí hay una alta presencia de FurB en la fracción de membrana. Se puede observar el monómero de FurB, con una masa molecular superior, de 18-19 kDa, así como un homodímero.

5.3. Búsqueda de FtsH en *Anabaena PCC7120*

Los resultados previos en los cuales se observaba que FurB podría estar unida a membrana y a un peso molecular del monómero superior al esperado, resultaron de gran interés. Por ello se estudió la bibliografía y se encontró que se había descrito la presencia en membranas de Fur de *Synechocystis PCC6803*, homólogo a FurA en *Anabaena PCC7120*, y que es proteolizada por una proteasa FtsH. Esto llevó a plantear la posibilidad de que FurB fuera sujeto de un mecanismo regulatorio similar. Como se ha comentado en el apartado de Introducción, *Synechocystis PCC6803* presenta cuatro proteínas FtsH. Sin embargo, los ortólogos de estas proteínas en *Anabaena PCC7120*

se desconocen. Por tanto, se llevó a cabo una búsqueda de proteínas FtsH presentes en *Anabaena* PCC7120 mediante la realización de un BLAST proteico con las secuencias de las distintas FtsH presentes en *Synechocystis* PCC6803.

En primer lugar, en vista de que las secuencias de las cuatro proteínas FtsH de *Synechocystis* PCC6803 son similares, se realizó un alineamiento de las secuencias de FtsH1-4 de *Synechocystis* PCC6803, para poder interpretar adecuadamente los resultados del BLAST con las proteínas de *Anabaena* PCC7120. Este alineamiento queda recogido en la figura S1 del Material Suplementario.

El alineamiento permitió observar que la secuencia N-terminal de estas proteínas se encuentra poco conservada, con grandes diferencias hasta los 150-200 residuos (Fig. S1 – Flecha azul). Sin embargo, la zona central, hasta los 375-400 residuos (Fig. S1 – Flecha naranja), se encuentra altamente conservada. Esta zona se corresponde con el dominio AAA+ ATPasa, siendo su conservación justificada por el carácter general de la función que ejerce esta región. Por otra parte, la zona C-terminal, correspondiente al dominio proteasa, mantiene una gran similitud, pero con una menor identidad, lo que podría indicar diferencias en la función proteasa de cada FtsH en *Synechocystis* PCC6803.

La realización de un BLAST mediante un algoritmo “BLASTP – 2 sequences” sobre estas secuencias permitió determinar un porcentaje de identidad entre cada pareja de estas cuatro proteínas de entre 48.61 % para FtsH2/FtsH4 y del 66.61 % para FtsH1/FtsH2, con un porcentaje de cobertura de entre el 86% y el 97%, respectivamente.

A continuación, se realizaron cuatro BLAST consecutivos con un algoritmo BLASTP “protein-protein BLAST”, cada uno con una FtsH de *Synechocystis* PCC6803 diferente y sobre el genoma de *Anabaena* PCC7120, a fin de determinar posibles ortólogos FtsH. En cada ocasión se seleccionaron los resultados con un e-valor cercano o igual a cero, correspondiente al máximo nivel de significación, así como un mínimo del 50% de identidad y de cobertura de secuencia. De esta forma, para cada una de las cuatro FtsH de *Synechocystis* PCC6803 se identificaron 4 posibles homólogos en *Anabaena* PCC7120, pero con diferentes valores para los parámetros considerados en el BLAST. Los resultados obtenidos se corresponden a las proteínas codificadas por los genes *all4776*, *all3642*, *all4936* y *alr1261*, cuyos parámetros de homología respecto a las diferentes FtsH de *Synechocystis* PCC6803 quedan recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados más significativos del análisis por BLAST de las cuatro proteínas FtsH de *Synechocystis* PCC6803 sobre *Anabaena* PCC7120, incluyendo los parámetros de porcentaje de identidad y cobertura de la secuencia de cada uno de los resultados con cada uno de los cuatro homólogos, así como el e-valor (indicativo de la significación del alineamiento).

	Identidad (%)				Cobertura (%)				E-valor			
	FtsH1	FtsH2	FtsH3	FtsH4	FtsH1	FtsH2	FtsH3	FtsH4	FtsH1	FtsH2	FtsH3	FtsH4
All4776	67.25	67.85	59.31	51.32	85	85	93	83	0.0	0.0	0.0	$1.8 \cdot 10^{-176}$
All3642	66.55	81.35	62.85	50.51	86	86	92	92	0.0	0.0	0.0	0.0
All4936	54.80	51.24	55.83	65.49	75	75	85	90	$5.1 \cdot 10^{-176}$	$2.3 \cdot 10^{-173}$	0.0	0.0
Alr1261	56.22	58.36	83.74	51.24	87	97	98	94	0.0	0.0	0.0	0.0

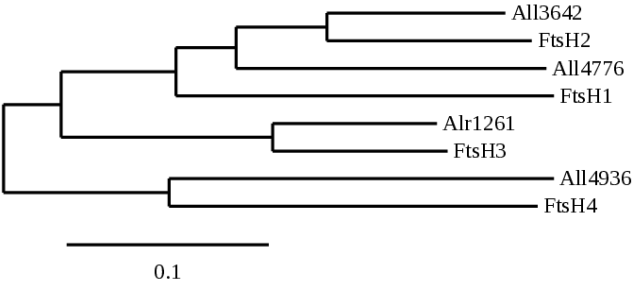
El porcentaje de identidad en la mayoría de casos se encuentra entre el 50.51% y 67.85%, mientras que el porcentaje de cobertura se encuentra a valores superiores al 75%. Las dos notables excepciones son All3642, que presenta un 81.35% de identidad con FtsH2, y Alr1261, con un 83.74% de identidad con FtsH3.

Se realizaron alineamientos de los cuatro posibles ortólogos en *Anabaena* PCC7120 individualmente con cada una de las FtsH1-4 de *Synechocystis* PCC6803, los cuales se incluyen en el Material Suplementario (Fig. S2 a S17). De forma general, los resultados son similares a los obtenidos en el alineamiento de FtsH1-4 (Fig. S1): la zona N-terminal está mínimamente conservada, la central presenta una alta identidad y la zona C-terminal se encuentra conservada en menor medida. Por lo tanto, es difícil asignar a cada FtsH de *Synechocystis* PCC6803 su ortólogo, ya que en la mayoría de los casos presentan una similitud similar a los homólogos de *Anabaena* PCC7120 a la que presentan entre sí.

Sin embargo, los alineamientos de All3642 con FtsH2 y de Alr1261 con FtsH3, en concordancia con los parámetros del BLAST obtenidos, revelaron una identidad casi completa a lo largo de la totalidad de sus secuencias. Por tanto, los resultados sugieren que los ortólogos FtsH2 y FtsH3 en *Anabaena* PCC7120 son All3642 (Fig. S7) y Alr1261 (Fig. S13), respectivamente.

Por último, se llevó a cabo un árbol filogenético incluyendo las secuencias de las FtsH descritas en *Synechocystis* PCC6803 y aquellas identificadas en *Anabaena* PCC7120, que se incluye en la figura 15. En este árbol, FtsH2 y All3642, así como FtsH3 y Alr1261, quedan agrupados en una misma rama del árbol, indicando cierta cercanía evolutiva.

Fig 15. Árbol filogenético derivado del alineamiento múltiples de las secuencias de las cuatro proteínas FtsH de *Synechocystis* PCC6803 y All4776, All3642, All4936 y Alr1261 de *Anabaena* PCC7120 generado por el método de Neighbour-joining por Clustal O y representado mediante TreeDyn.



6. DISCUSIÓN

La regulación de la expresión génica es vital para el correcto desarrollo de los seres vivos y su adaptación a un entorno cambiante. Los factores de transcripción permiten la represión o activación de la expresión de genes específicos en respuesta a diferentes señales ambientales, mediante rutas de señalización que pueden incluir mecanismos como las interacciones transitorias entre proteínas (55). La interacción entre factores de transcripción puede llevar a diferencias en el patrón de expresión génica, ya sea por la inhibición de su función por mutuo secuestro o mediante la alteración de su especificidad de unión. Esto puede observarse en ejemplos como el de los hetero-oligómeros alternativos de los reguladores de respuesta HsfA y MXAN4899 (69).

Anabaena PCC7120 presenta tres proteínas pertenecientes a la superfamilia FUR de reguladores transcripcionales, denominadas FurA, FurB y FurC. Ya que se había observado anteriormente su capacidad de interregulación (33), así como indicios de que al menos FurB y FurC podrían estar interaccionando tanto *in vitro* como *in vivo* (45,46), se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de profundizar en el estudio de la posible interacción entre FurB y FurC.

6.1. FurB interacciona con el complejo FurC/DNA *in vitro*

Los resultados obtenidos de los ensayos de retardo de la movilidad electroforética llevados a cabo en este trabajo, no permitieron observar un efecto de FurC sobre la capacidad de unión de FurB a los promotores de genes que regula. Sin embargo, sí se observó que FurB es capaz de formar un complejo junto con FurC y el promotor del gen *hetZ* *in vitro*, incrementando el retardo de la banda, pero no directamente al promotor en ausencia de FurC. Por tanto, este efecto no estaría teniendo lugar por la interacción directa con el DNA, sugiriendo que se debe a la interacción de FurB con FurC en presencia de la secuencia promotora a la que FurC se une.

Dado que los EMSAs son ensayos *in vitro*, es posible que esta interacción no tenga lugar en las condiciones *in vivo*, así como que sí exista un efecto inhibitor o potenciador de la unión de cada parólogo a sus promotores diana en presencia del otro, en condiciones diferentes a las empleadas en los ensayos. Tanto FurB como FurC son proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo, por lo que su estado redox podría influir en su potencial interacción y/o sus efectos funcionales. Adicionalmente, en este trabajo se ha analizado únicamente el efecto de la presencia de FurB sobre la unión de FurC al promotor de *hetZ*, por lo que en el futuro se deberán realizar experimentos similares con otras dianas directas de FurC para estudiar si el efecto es específico para algunos promotores o si, por el contrario, se trata de un efecto generalizado.

De ser un efecto generalizado, las consecuencias fisiológicas que produciría este aumento de la unión de FurC a sus promotores en presencia de FurB podrían ser varias. En el caso de que FurC actúe como represor, la presencia de FurB estaría produciendo la hiper-represión de los genes regulados por FurC. Sin embargo, también se ha descrito que FurC, al igual que otros parálogos Fur, podría estar actuando en ciertas ocasiones como activador transcripcional, como es el caso de *hetZ* (43,137). En estos casos, la unión de FurB podría potenciar la activación de la expresión. A fin de determinar el significado fisiológico de la interacción observada, sería necesario comprobar el efecto sobre la expresión génica a través de técnicas *in vivo*, como la qRT-PCR comparativa entre la cepa WT y cepas de sobreexpresión y/o delección de FurB y FurC.

6.2. No se observan hetero-oligómeros FurB/FurC *in vivo* en *Anabaena* PCC7120

A pesar de las evidencias de que existe una interacción entre FurB y FurC, ninguna de las muestras analizadas por Western blot mostró contener formas oligoméricas de FurB y FurC compatibles con hetero-oligómeros, tanto en fracciones de proteína soluble como de proteína de membrana. Aunque se observaron en ambos casos bandas proteicas de peso molecular compatibles con dímeros, su presencia en el mutante de delección de FurB al revelar con anticuerpo anti-FurC permitiría descartar que se tratara de heterodímeros, siendo probablemente homodímeros FurB/FurB y FurC/FurC, respectivamente, al revelar con anticuerpos contra FurB o FurC.

Las bandas proteicas de peso molecular compatible con trímeros se observaron de forma continuada en todas las muestras analizadas, incluidas las correspondientes a la cepa de delección de FurB al revelar con un anticuerpo anti-FurB, por lo que no se trataría de un heterotrímero. Sin embargo, sí podría ser un verdadero homotrímero de FurC.

El hecho de que no se observe la presencia de hetero-oligómeros *in vivo* en los ensayos realizados, pese a su capacidad de interaccionar observada previamente *in vitro* e *in vivo* en un sistema heterólogo, puede deberse a varias razones. En primer lugar, es posible que realmente no interaccionen en las condiciones de cultivo empleadas, pudiendo ser necesarias condiciones específicas para su establecimiento *in vivo*. Esto estaría en concordancia con resultados previos de ensayos de doble híbrido, mostrando su interacción en medio completo, que incluye extracto de levadura, pero no en medio mínimo, por lo que esta interacción podría ser sensible a las condiciones de cultivo (46).

Por otro lado, los hetero-oligómeros pueden estar estableciendo interacciones débiles, disociándose durante el proceso de extracción y separación electroforética. Aunque se

pueden observar bandas compatibles con homo-dímeros tanto para FurB como para FurC, las potenciales interacciones FurB/FurC pueden basarse en fuerzas de diferente naturaleza a las que estabilizan los homo-oligómeros. De esta forma, es posible que las condiciones del ensayo no afecten a los homo-dímeros, pero sí provoquen la disociación de los potenciales hetero-oligómeros, para los cuales se ha observado al menos que su interacción *in vitro* se ve debilitada por el aumento de la fuerza iónica en el medio (46).

Por último, de haber interacción *in vivo*, podría ser de naturaleza transitoria y puntual en el tiempo, sin formar complejos estables de duración suficiente para ser detectables por la metodología de Western blot. Las interacciones transitorias que no generan hetero-oligómeros estables pueden ser igualmente detectadas por diferentes metodologías de estudio de interacciones proteicas, como los ensayos de doble híbrido. Ya que interacción entre FurB y FurC se observa mediante ensayos de doble híbrido, pero no se detecta la presencia de heteroligómeros mediante Western blot, es probable que estas interacciones no sean del todo estables.

Un aspecto que hay que tener en cuenta es la accesibilidad *in vivo* de FurB a FurC y viceversa. Aunque FurB se encuentra también soluble, su alta presencia en membrana puede significar que *in vivo* en condiciones estándar tiene un acceso limitado a FurC, lo que puede impedir la formación de hetero-oligómeros en cantidad significativa. Los ensayos previos realizados de doble híbrido en sistema heterólogo se basan en la expresión en *E. coli*, que como bacteria heterótrofa no presenta membranas tilacoidales y, por tanto, podría no reproducir la unión de FurB a membranas *in vivo* en *Anabaena* PCC7120 y las consecuencias de esto sobre la interacción entre ambas.

6.3. FurB se localiza en membranas de *Anabaena* PCC7120

El análisis de muestras de proteínas de diferentes cepas de *Anabaena* PCC7120 mediante Western blot con revelado con un anticuerpo policlonal anti-FurB permitió observar la presencia de FurB tanto en proteína soluble como en fracción de proteína de membrana. Además, aunque en la fracción soluble se detectó a su peso molecular esperado, de 15kDa, en el caso de proteína de membranas se observó a 18-19kDa. Esto podría estar indicando la unión a membrana mediante interacción con un polipéptido de 3-4 kDa, que pudiera ser un linker de unión a membrana, o una proteína de peso molecular superior que sea procesada. La intensidad de las bandas obtenidas para la cepa WT indicaría que FurB estaría presente en membrana en mayor medida que en fracción soluble en condiciones normales. Esto resulta sorprendente, ya que los homólogos Zur están descritos como proteínas solubles y no se conocen resultados previos indicando su abundante presencia en membranas en otros organismos. Dado

que se observa el caso contrario para FurC, que apenas aparece en la fracción de membranas en comparación a su presencia en proteína soluble, no se considera que se pudiera deber a una contaminación de la muestra de membrana por proteínas de la fracción soluble.

Aunque el método de extracción empleado no permite discernir el tipo de membrana a la cual estas proteínas se podrían estar uniendo (tilacoidal, celular o ambas), experimentos previos de *pull down* llevados a cabo en nuestro laboratorio indicaron que existía interacción de FurB con proteínas identificadas como componentes del ficobilisoma, como polipéptidos linker de entre 34.5 y 7.8 kDa o subunidades de ficobiliproteínas (138). Esto sugiere que podría estar localizada en la membrana tilacoidal. Aunque la interacción con polipéptidos linker se aplique principalmente a la unión de ficobiliproteínas al complejo del ficobilisoma, también hay casos en los que otras proteínas pueden establecer este tipo de interacciones. Por ejemplo, la proteína FNR se asocia a los ficobilisomas de cloroplastos mediante un linker polipeptídico, homólogo a la secuencia terminal que permite la interacción de la FNR a los ficobilisomas en cianobacterias como *Synechocystis* PCC6803 (119).

Previsiblemente, la interacción con la membrana constituiría un mecanismo de regulación negativa sobre la acción de FurB, impidiendo o dificultando su acceso a los promotores de genes que regula. Los ejemplos incluidos en el apartado 2.7 de la introducción ponen de manifiesto que la localización en membrana de proteínas cuya función tiene lugar por interacción directa con el DNA constituye frecuentemente un mecanismo regulatorio de inhibición, siendo su liberación al citosol un paso de regulación necesario para su actividad. Este es el caso, por ejemplo, de factores σ como σ^W en *B. subtilis* (110) o el factor de transcripción asociado a membrana GrlA de *E. coli*, liberado al citoplasma en su forma activa en respuesta a estímulos mecánicos (139).

Sin embargo, existen casos aislados como el de CadC de *Vibrio cholerae*, un activador transcripcional transmembrana que no requiere procesamiento proteolítico para unirse al promotor del operón que regula, *cadBA*, sino que se une directamente desde la membrana (140). Por otro lado, recientemente Krynická *et al.* detectaron la presencia de Fur, homólogo a FurA en *Anabaena* PCC7120, en la membrana citoplasmática celular, proponiendo que este factor de transcripción podría estar mediando la interacción de la membrana con el DNA y que en condiciones de depleción de hierro Fur se liberaría del DNA, siendo accesible al complejo FtsH1/FtsH3 para su posterior degradación (128). Por tanto, no se puede descartar que FurB sea activa en membrana, de forma no excluyente con su funcionalidad en el citosol. Se trata de un aspecto que habría que estudiar más en detalle.

6.4. *Anabaena* PCC7120 contiene cuatro potenciales homólogos FtsH

A la vista de los resultados de BLAST y alineamientos, *Anabaena* PCC7120 parece presentar cuatro formas de FtsH con similitud de secuencia a las de la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803: All4776, All3642, All4936 y Alr1261. De entre estas proteínas, All4776 se ha visto implicada en estudios previos acerca de los parálogos Fur de *Anabaena* PCC7120: se corresponde a un gen previamente determinado como diana de FurC, capaz de unirse a su promotor y previsiblemente activar su transcripción, ya que la sobreexpresión de FurC lleva a un aumento de la expresión *in vivo* de *all4776*.

Los resultados de los alineamientos y el árbol filogenético sugieren que All3642 y Alr1261 podrían ser los ortólogos FtsH2 y FtsH3, respectivamente, en *Anabaena* PCC7120. En este sentido, podrían estar implicadas en el mantenimiento de la cadena fotosintética, de forma similar al complejo FtsH2/3 en *Synechocystis* PCC6803. Aunque no se observa un potencial ortólogo FtsH1, es posible que Alr1261, de forma similar a FtsH3 en complejo con FtsH1, participe en la degradación de reguladores transcripcionales, lo cual podría incluir alguno de los parálogos Fur de *Anabaena* PCC7120.

Por otro lado, All4776 y All4936 no muestran suficiente homología con ninguna de las FtsH de *Synechocystis* PCC6803, aunque All4936 queda agrupado junto con FtsH4 en el árbol filogenético. Sin embargo, la alta homología observada ya entre FtsH1-4 indicaría que este nivel de similitud no implica equivalencia funcional.

Es posible que *Anabaena* PCC7120 no presente un ortólogo FtsH4, ya que se trata de una proteína no esencial en *Synechocystis* PCC6803. Respecto a FtsH1, de ser igualmente esenciales en *Anabaena* PCC7120 las funciones que realiza en *Synechocystis* PCC6803, es posible que All4776 o All4936 estén actuando como éstas pese a su menor nivel de identidad, o que haya habido una distribución diferente de sus funciones entre ellas u otras proteínas no relacionadas, de forma que no se mantuviera la identidad de secuencia.

Dada la presencia en membrana de FurB y los precedentes de regulación por proteólisis de homólogos FUR como PerR de *B. subtilis* (130) y Fur de *Synechocystis* PCC6803 (128), no sería de extrañar que alguna de estas potenciales FtsH, como proteasas de membrana, participen en un mecanismo regulatorio similar sobre esta proteína. Será necesario estudiar más en detalle acerca de la relevancia fisiológica de estas observaciones acerca de la localización de FurB y su potencial regulación proteolítica.

7. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo ha permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. FurB es capaz de interactuar *in vitro* con FurC, potenciando su unión al promotor de *hetZ*.
2. No se ha observado la presencia de hetero-oligómeros estables de FurB y FurC *in vivo* en extractos celulares de *Anabaena* PCC7120 en condiciones normales de cultivo, lo que sugiere que su interacción *in vivo* podría ser transitoria o poco estable, o podría estar limitada a condiciones específicas.
3. Una fracción del total de la proteína FurB parece encontrarse asociada a membranas, con presencia mayor que en proteína soluble, potencialmente mediante su interacción con un polipéptido linker.
4. *Anabaena* PCC7120 presenta cuatro proteínas FtsH, dos de las cuales son potenciales ortólogos de FtsH2 y FtsH3 de *Synechocystis* PCC6803.

7. CONCLUSIONS

The results obtained from this work have allowed us to reach the following conclusions:

1. FurB can interact *in vivo* with FurC, which results in an enhanced association to the *hetZ* promoter.
2. FurB and FurC don't appear to form *in vivo* stable hetero-oligomers detectable in *Anabaena* PCC7120 cellular extracts grown under normal conditions, which suggests their *in vivo* interaction would be unstable or transient, or take place only under a specific cellular context.
3. A fraction of the cellular FurB content can be found bound to membranes, with a more significant presence than in the soluble protein fraction and being potentially associated to these membranes through an interaction with a linker polypeptide.
4. *Anabaena* PCC7120 contains four FtsH proteins, two of which are potential orthologs for FtsH2 and FtsH3 of PCC6803.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. Vol. 506, Nature. 2014. p. 307–15.
2. Holland HD. The oxygenation of the atmosphere and oceans. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2006;361(1470):903–15.
3. Schirrmeister BE, De Vos JM, Antonelli A, Bagheri HC. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110(5):1791–6.
4. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. Proc Natl Acad Sci. 1990; 87(12):4576–9.
5. Whitton BA, Potts M, editors. The Ecology of Cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2002.
6. Bothe H, Schmitz O, Yates MG, Newton WE. Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Cyanobacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(4):529–51.
7. Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. Science. 1998; 281(5374): 237–40.
8. Archibald JM. The Puzzle of Plastid Evolution. Curr Biol. 2009;19(2):R81–8.
9. Grube M, Seckbach J, Muggia L, Rikkinen J. Symbiotic Cyanobacteria in Lichens. In: Algal and Cyanobacteria Symbioses. World scientific (Europe); 2017. p. 147–67.
10. Adams DG, Bergman B, Nierzwicki-Bauer SA, Duggan PS, Rai AN, Schüßler A. Cyanobacterial-plant symbioses. In: The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. p. 359–400.
11. Khan Z, Bhadouria P, Bisen P. Nutritional and Therapeutic Potential of *Spirulina*. Curr Pharm Biotechnol. 2005;6(5):373–9.
12. Chittora D, Meena M, Barupal T, Swapnil P. Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. Biochem Biophys Reports. 2020;22:100737.
13. Zinicovscaia I, Cepoi L, editors. Cyanobacteria for bioremediation of wastewaters. Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters. Springer International Publishing; 2016. 1–124 p.
14. Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. Trends Biotechnol. 2011;29(2):95–103.
15. Angermayr SA, Gorchs Rovira A, Hellingwerf KJ. Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. Trends Biotechnol. 2015;33(6):352–61.
16. Paerl HW, Otten TG. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. Microb Ecol. 2013;65(4):995–1010.
17. Christian Fischer. Cyanobacteria Fishpond 2. Wikimedia Commons. 2017.
18. Singh SP, Montgomery BL. Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. Trends Microbiol. 2011;19(6):278–8.

19. Dvořák P, Pouličková A, Hašler P, Belli M, Casamatta DA, Papini A. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodivers Conserv*. 2015;24(4):739–57.
20. Mullineaux CW. The thylakoid membranes of cyanobacteria: Structure, dynamics and function. *Aust J Plant Physiol*. 1999;26(7):671–7.
21. Glauser M, Bryant DA, Frank G, Wehrli E, Rusconi SS, Sidler W, et al. Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Anabaena* sp. PCC 7120. *Eur J Biochem*. 1992;205(3):907–15.
22. Kaplan-Levy RN, Hadas O, Summers ML, Rücker J, Sukenik A. Akinetes: Dormant cells of cyanobacteria. *Top Curr Genet*. 2010;21:5–27.
23. Marsac NT. Differentiation of Hormogonia and Relationships with Other Biological Processes. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands; 1994. p. 825–42.
24. Kumar K, Mella-Herrera RA, Golden JW. Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(4).
25. Videau P, Cozy LM. *Anabaena* sp. strain PCC 7120: Laboratory Maintenance, Cultivation, and Heterocyst Induction. *Curr Protoc Microbiol*. 2019;52(1):e71.
26. Hantke K. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: Isolation of a constitutive mutant. *MGG Mol Gen Genet*. 1981;182(2):288–92.
27. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(7):443–54.
28. Lee JW, Helmann JD. Functional specialization within the fur family of metalloregulators. In: *BioMetals*. Biometals; 2007. p. 485–99.
29. Coy M, Neilands JB. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry*. 1991;30(33):8201–10.
30. Pérard J, Covès J, Castellan M, Solard C, Savard M, Miras R, et al. Quaternary Structure of fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry*. 2016;55(10):1503–15.
31. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*. 2014;546:41–52.
32. Bags A, Neilands JB. Ferric Uptake Regulation Protein Acts as a Repressor, Employing Iron(II) as a Cofactor To Bind the Operator of an Iron Transport Operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1987;26(17):5471–7.
33. Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;236(3):275–82.
34. Sein-Echaluce VC, González A, Napolitano M, Luque I, Barja F, Peleato ML, et al. Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ Microbiol*. 2015;17(6):2006–17.
35. Yingping F, Lemeille S, Talla E, Janicki A, Denis Y, Zhang C-C, et al. Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (*alr0957*) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *Environ Microbiol Rep*. 2014;6(5):468–75.

36. González A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Expanding the Role of FurA as Essential Global Regulator in Cyanobacteria. Hess WR, editor. PLoS One. 2016;11(3):e0151384.
37. Hernández JA, Peleato ML, Fillat MF, Bes MT. Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. FEBS Lett. 2004;577(1–2):35–41.
38. González A, Espinosa Angarica V, Sancho J, Fillat MF. The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120: in silico prediction and experimental validation of novel target genes. Nucleic Acids Res. 2014;42(8):4833–46.
39. Napolitano M, Rubio MÁ, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ, Luque I. Characterization of the Response to Zinc Deficiency in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. 2012;194(10):2426–2436
40. Sein-Echaluce VC, González A, Napolitano M, Luque I, Barja F, Peleato ML, et al. Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. Environ Microbiol. 2015;17(6):2006–17.
41. López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. New insights into the role of Fur proteins: FurB (AlI2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. Biochem J. 2009;418(1):201–7.
42. Sevilla E, Sarasa-Buisan C, González A, Cases R, Kufryk G, Peleato ML, et al. Regulation by FurC in *Anabaena* Links the Oxidative Stress Response to Photosynthetic Metabolism. Plant Cell Physiol. 2019; 60(8):1778–1789.
43. Guío-Martínez J. Nuevas funciones de las proteínas Fur en el metabolismo del nitrógeno de *Anabaena* PCC7120 y su posible actuación como sensores del balance carbono/nitrógeno. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza; 2019.
44. Lee J-W, Helmann JD. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. Nature. 2006;440(7082):363–7.
45. Sarasa-Buisan C. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza;
46. Oliván Muro I. Estudio de la interacción entre las proteínas Fur de *Anabaena* sp. PCC7120. Universidad de Zaragoza; 2019.
47. Marianayagam NJ, Sunde M, Matthews JM. The power of two: protein dimerization in biology. Trends Biochem Sci. 2004;29(11):618–25.
48. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. Microbiol Rev. 1995;59(1):94–123.
49. Carro L. Protein-protein interactions in bacteria: A promising and challenging avenue towards the discovery of new antibiotics. Beilstein J Org Chem. 2018;14:2881–96.
50. L. Garner A, D. Janda K. Protein-Protein Interactions and Cancer: Targeting the Central Dogma. Curr Top Med Chem. 2010;11(3):258–80.
51. Lin CC, Juan HF, Hsiang JT, Hwang YC, Mori H, Huang HC. Essential core of protein-protein interaction network in *Escherichia coli*. J Proteome Res. 2009;8(4):1925–31.
52. Hauser R, Ceol A, Rajagopala S V., Mosca R, Siszler G, Wermke N, et al. A second-generation protein-protein interaction network of *Helicobacter pylori*. Mol Cell Proteomics. 2014;13(5):1318–29.

53. Wang Y, Cui T, Zhang C, Yang M, Huang Y, Li W, et al. Global protein-protein interaction network in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6665–77.
54. Lv Q, Ma W, Liu H, Li J, Wang H, Lu F, et al. Interactions and protein function exploration in cyanobacteria. *Sci Rep.* 2015;5(1):1–12.
55. Acuner Ozbabacan SE, Engin HB, Gursoy A, Keskin O. Transient protein-protein interactions. *Protein Eng Des Sel.* 2011;24(9):635–48.
56. Noirot P, Noirot-Gros MF. Protein interaction networks in bacteria. *Current Opinion in Microbiology. Elsevier Current Trends.* 2004. 7(5);505–12.
57. Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012;4(6):565–83.
58. Ehrmann M, Clausen T. Proteolysis as a Regulatory Mechanism. *Annu Rev Genet.* 2004;38(1):709–24.
59. Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW. From molecular to modular cell biology. *Nature.* 1999;402(S6761):C47–52.
60. Goodsell DS, Olson AJ. Structural symmetry and protein function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000;29(1):105–53.
61. Werner F, Grohmann D. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(2):85–98.
62. Finn RD, Orlova E V, Gowen B, Buck M, Van Heel M. *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures. *EMBO J.* 2000;19(24):6833–44.
63. Pereira-Leal JB, Levy ED, Teichmann SA. The origins and evolution of functional modules: Lessons from protein complexes. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2006; 361(1467): 507–17.
64. Gruber TM, Gross CA. Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57(1):441–66.
65. Rouvière PE, De Las Peñas A, Mecsas J, Lu CZ, Rudd KE, Gross CA. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 1995; 14(5):1032–42.
66. Wang S, Fleming RT, Westbrook EM, Matsumura P, McKay DB. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol.* 2006 Jan 27;355(4):798–808.
67. Mittal S, Kroos L. A combination of unusual transcription factors binds cooperatively to control *Myxococcus xanthus* developmental gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(6):1965–70.
68. Mouslim C, Latifi T, Groisman EA. Signal-dependent Requirement for the Co-activator Protein RcsA in Transcription of the RcsB-regulated *ugd* Gene. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50588–95.
69. Volz C, Kegler C, Müller R. Enhancer binding proteins act as hetero-oligomers and link secondary metabolite production to myxococcal development, motility, and predation. *Chem Biol.* 2012;19(11):1447–59.

70. Bächler C, Schneider P, Bähler P, Lustig A, Erni B. *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *EMBO J.* 2005;24(2):283–93.
71. Wray L V., Zalieckas JM, Fisher SH. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell.* 2001; 107(4):427–35.
72. Kürsad T, Hahn J, Burghoorn J, Dubnau D. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* 1998;17(22):6730–8.
73. Gerdes K, Christensen SK, Løbner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(5):371–82
74. Cheng L, Lin H, Fan X, Qiu S, Sun T, Li TY, et al. A novel toxin-antitoxin operon talA/B from the Gram-positive bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*. *FEBS Lett.* 2008;582(21–22):3211–6.
75. Koskinen S, Hakkila K, Gunnelius L, Kurkela J, Wada H, Tyystjärvi T. *In vivo* recruitment analysis and a mutant strain without any group 2 σ factor reveal roles of different σ factors in cyanobacteria. *Mol Microbiol.* 2016;99(1):43–54.
76. Osanai T, Imashimizu M, Seki A, Sato S, Tabata S, Imamura S, et al. ChlH, the H subunit of the Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(16):6860–5.
77. Kujirai J, Nanba S, Kadowaki T, Oka Y, Nishiyama Y, Hayashi Y, et al. Interaction of the GntR-family transcription factor Sll1961 with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci Rep.* 2018;8(1).
78. Horiuchi M, Nakamura K, Kojima K, Nishiyama Y, Hatakeyama W, Hisabori T, et al. The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria. *Biochem J.* 2010;431(1):135–40.
79. Kadowaki T, Nishiyama Y, Hisabori T, Hihara Y. Identification of OmpR-Family Response Regulators Interacting with Thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Chauvat F, editor. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119107.
80. Oliveira P, Lindblad P. Novel insights into the regulation of LexA in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol.* 2011;193(15):3804–14.
81. Ehira S, Ohmori M. The redox-sensing transcriptional regulator RexT controls expression of thioredoxin A2 in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40433–40.
82. Huergo LF, Dixon R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;79(4):419–35.
83. Forcada-Nadal A, Llácer JL, Contreras A, Marco-Marín C, Rubio V. The PII-NAGK-PipX-NtcA Regulatory Axis of Cyanobacteria: A Tale of Changing Partners, Allosteric Effectors and Non-covalent Interactions. *Front Mol Biosci.* 2018;5(November):1–18.
84. Wilcox M, Mitchison GJ, Smith RJ. The heterocysts of blue-green algae (*Myxophyceae*). *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1975 Aug;50(3):247–84.
85. Valladares A, Herrero A. Interactions of PatA with the Divisome during Heterocyst Differentiation in *Anabaena*. *mSphere.* 2020;5(3):1–16.

86. Wang Z, Lu W, Rajapaksha P, Wilkop T, Cai Y, Wei Y. Comparison of *in vitro* and *in vivo* oligomeric states of a wild type and mutant trimeric inner membrane multidrug transporter. *Biochem Biophys Reports*. 2018;16:122–9.
87. Karst JC, Foucher A-E, Campbell TL, Di Guilmi A-M, Stroebel D, Mangat CS, et al. The ATPase activity of an “essential” *Bacillus subtilis* enzyme, YdiB, is required for its cellular function and is modulated by oligomerization. *Microbiology*. 2009;155:944–56.
88. Zheng J, Du GG, Anderson CT, Keller JP, Orem A, Dallos P, et al. Analysis of the oligomeric structure of the motor protein prestin. *J Biol Chem*. 2006;281(29):19916–24.
89. Israeli E, Sharon R. β -synuclein occurs *in vivo* in lipid-associated oligomers and forms hetero-oligomers with α -synuclein. *J Neurochem*. 2009;108(2):465–74.
90. Tang X, Bruce JE. Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies. *Methods Mol Biol*. 2009;492:283–93.
91. Yang B, Tang S, Ma C, Li ST, Shao GC, Dang B, et al. Spontaneous and specific chemical cross-linking in live cells to capture and identify protein interactions. *Nat Commun*. 2017;8(1):1–10.
92. Haft RJF, Gachelet EG, Nguyen T, Toussaint L, Chivian D, Traxler B. *In vivo* oligomerization of the F conjugative coupling protein TraD. *J Bacteriol*. 2007;189(18):6626–34.
93. Solis GP, Hoegg M, Munderloh C, Schrock Y, Malaga-Trillo E, Rivera-Milla E, et al. Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochem J*. 2007;403(2):313–22.
94. Machida K, Mayer BJ. Detection of protein-protein interactions by far-western blotting. *Methods Mol Biol*. 2009;536:313–29.
95. Herlihey FA, Osorio-Valeriano M, Dreyfus G, Clarke AJ. Modulation of the lytic activity of the dedicated autolysin for flagellum formation SlfF by flagellar rod proteins FlgB and FlgF. Christie PJ, editor. *J Bacteriol*. 2016; 198(13):1847–56.
96. Sato Y, Kameya M, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. Detecting weak protein-protein interactions by modified far-western blotting. *J Biosci Bioeng*. 2011;112(3):304–7.
97. Cubillos-Rojas M, Schneider T, Sánchez-Tena S, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. Analysis of protein oligomerization by electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2016;1449:341–8.
98. Margineanu A, Chan JJ, Kelly DJ, Warren SC, Flatters D, Kumar S, et al. Screening for protein-protein interactions using Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Sci Rep*. 2016;6(1):1–17.
99. Wu Y, Eghbali M, Ou J, Lu R, Toro L, Stefani E. Quantitative determination of spatial protein-protein correlations in fluorescence confocal microscopy. *Biophys J*. 2010;98(3):493–504.
100. Legrain P, Selig L. Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Lett*. 2000;480(1):32–6.
101. Jenal U, Hengge-Aronis R. Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(2):163–72.
102. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*. 2000;100(4):391–8..

103. Kinch LN. Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: Sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. *Protein Sci.* 2006;15(1):84–93.
104. Kinch LN, Grishin N V. Bioinformatics perspective on rhomboid intramembrane protease evolution and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2013;1828(12):2937–43.
105. Stragier P, Losick R. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet.* 1996;30(1):297–341.
106. Eichenberger P, Jensen ST, Conlon EM, Van Ooij C, Silvaggi J, González-Pastor JE, et al. The σ^E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol.* 2003;327(5):945–72.
107. Zhang B, Hofmeister A, Kroos L. The prosequence of pro- $\sigma(K)$ promotes membrane association and inhibits RNA polymerase core binding. *J Bacteriol.* 1998;180(9):2434–41.
108. Resnekov O, Alper S, Losick R. Subcellular localization of proteins governing the proteolytic activation of a developmental transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Genes to Cells.* 1996;1(6):529–42.
109. Ramírez-Guadiana FH, Rodrigues CDA, Marquis KA, Campo N, Barajas-Ornelas R del C, Brock K, et al. Evidence that regulation of intramembrane proteolysis is mediated by substrate gating during sporulation in *Bacillus subtilis*. Kearns DB, editor. *PLOS Genet.* 2018;14(11):e1007753.
110. Schöbel S, Zellmeier S, Schumann W, Wiegert T. The *Bacillus subtilis* σ^W anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol Microbiol.* 2004;52(4):1091–105.
111. De Las Peñas A, Connolly L, Gross CA. The $\sigma(E)$ -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of $\sigma(E)$. *Mol Microbiol.* 1997;24(2):373–85.
112. Alba BM, Leeds JA, Onufryk C, Lu CZ, Gross CA. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the σ^E -dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* 2002;16(16):2156–68.
113. Flynn JM, Levchenko I, Sauer RT, Baker TA. Modulating substrate choice: The SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev.* 2004;18(18):2292–301.
114. Chen JC, Viollier PH, Shapiro L. A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant. *Mol Microbiol.* 2005;55(4):1085–103.
115. Viollier PH, Sternheim N, Shapiro L. Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(21):13831–6.
116. An FY, Sulavik MC, Clewell DB. Identification and characterization of a determinant (eep) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J Bacteriol.* 1999;181(19):5915–21.
117. Deboosère N, Iantomasi R, Queval CJ, Song O-R, Deloison G, Jouny S, et al. LppM impact on the colonization of macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol.* 2017;19(1):e12619.

118. Barthe P, Veyron-Churlet R, de Visch A, Gilleron M, Saliou JM, Tomavo S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* LppM Displays an Original Structure and Domain Composition Linked to a Dual Localization. *Structure*. 2016;24(10):1788–94.
119. Van Thor JJ, Jeanjean R, Havaux M, Sjollem KA, Joset F, Hellingwerf KJ, et al. Salt shock-inducible Photosystem I cyclic electron transfer in *Synechocystis* PCC6803 relies on binding of ferredoxin:NADP⁺ reductase to the thylakoid membranes via its CpcD phycobilisome-linker homologous N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2000;1457(3):129–44.
120. Thomas JC, Ughy B, Lagoutte B, Ajlani G. A second isoform of the ferredoxin:NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(48):18368–73.
121. Fillat MF, Flores E, Gómez-Moreno C. Homology of the N-terminal domain of the petH gene product from *Anabaena* sp. PCC 7119 to the CpcD phycobilisome linker polypeptide. *Plant Mol Biol*. 1993;22(4):725–9.
122. Gómez-Lojero C, Pérez-Gómez B, Shen G, Schluchter WM, Bryant DA. Interaction of Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreductase with Phycobilisomes and Phycobilisome Substructures of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002. *Biochemistry*. 2003;42(47):13800–11.
123. Mann NH, Novac N, Mullineaux CW, Newman J, Bailey S, Robinson C. Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett*. 2000;479(1–2):72–7.
124. Boehm M, Yu J, Krynicka V, Barker M, Tichy M, Komenda J, et al. Subunit organization of a *Synechocystis* hetero-oligomeric thylakoid FtsH complex involved in photosystem II repair. *Plant Cell*. 2012;24(9):3669–83.
125. Silva P, Thompson E, Bailey S, Kruse O, Mullineaux CW, Robinson C, et al. FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell*. 2003;15(9):2152–64.
126. Stirnberg M, Fulda S, Huckauf J, Hagemann M, Krämer R, Marin K. A membrane-bound FtsH protease is involved in osmoregulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803: the compatible solute synthesizing enzyme GgpS is one of the targets for proteolysis. *Mol Microbiol*. 2007;63(1):86–102.
127. Zhang P, Sicora CI, Vorontsova N, Allahverdiyeva Y, Battchikova N, Nixon PJ, et al. FtsH protease is required for induction of inorganic carbon acquisition complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol*. 2007;65(3):728–40.
128. Krynická V, Tichý M, Krafl J, Yu J, Kaňa R, Boehm M, et al. Two essential FtsH proteases control the level of the Fur repressor during iron deficiency in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol*. 2014;94(3):609–24.
129. Krynicka V, Georg J, Jackson PJ, Dickman MJ, Hunter CN, Futschik ME, et al. Depletion of the FtsH1/3 proteolytic complex suppresses the nutrient stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Plant Cell*. 2019;31(12):2912–28.
130. Ahn B-E, Baker TA. Oxidization without substrate unfolding triggers proteolysis of the peroxide-sensor, PerR. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(1):E23–31..
131. Broset E. Rol de FurC *Anabaena* sp. PCC 7120. Trabajo fin de máster. 2012.

132. Lee MH, Scherer M, Rigali S, Golden JW. PlmA, a New Member of the GntR Family, Has Plasmid Maintenance Functions in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2003;185(15):4315–25.
133. González A, Bes MT, Barja F, Peleato ML, Fillat MF. Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 Reveals New Targets for This Regulator Involved in Photosynthesis, Iron Uptake and Cellular Morphology. *Plant Cell Physiol.* 2010;51(11):1900–14.
134. Rippka R. Isolation and Purification of Cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 1988;167(C):3–27.
135. Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. Growth phase-dependent regulation of target gene promoters for binding of the essential orphan response regulator HP1043 of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2002;184(17):4800–10.
136. Zhang H, Wang S, Wang Y, Xu X. Functional overlap of *hetP* and *hetZ* in regulation of heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* 2018;200(9).
137. Delany I, Rappuoli R, Scarlato V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 2004;52(4):1081–90.
138. Sein-echaluce VC. Estudio funcional de la proteína FurB (Zur) de *Anabaena* sp . PCC 7120: caracterización bioquímica e implicación en la respuesta a estrés oxidativo. Tesis Doctoral. 2016.
139. Sirisaengtaksin N, Odem MA, Bosserman RE, Flores EM, Krachler AM. The *E. Coli* transcription factor GrlA is regulated by subcellular compartmentalization and activated in response to mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(17):9519–28.
140. Jung K, Fabiani F, Hoyer E, Lassak J. Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing. *Open Biol.* 2018;8(4).